

University of Groningen

**Biochemische aspecten van experimenteel hersenoedeem. Het effect van hypoxie en ouabaine op de samenstelling van geïsoleerd oedeemvocht**

Gazendam, Jurjen

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
1978

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Gazendam, J. (1978). Biochemische aspecten van experimenteel hersenoedeem. Het effect van hypoxie en ouabaine op de samenstelling van geïsoleerd oedeemvocht. [Groningen]: [S.n.].

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

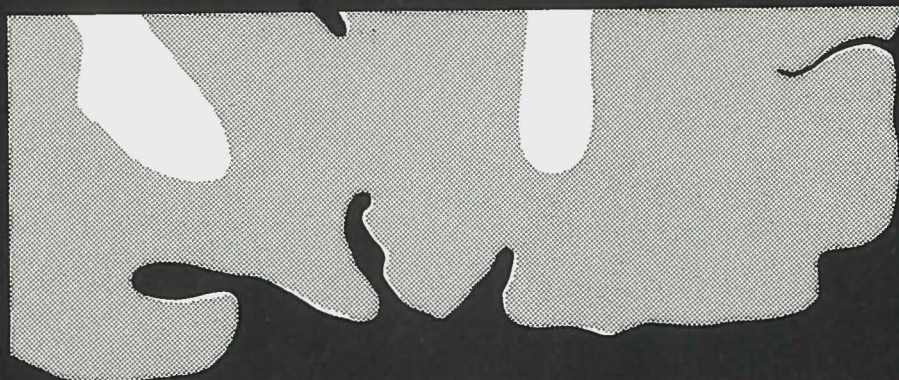
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

J. GAZENDAM

# **biochemische aspecten van experimenteel hersenoedeem**

het effect van  
hypoxie en ouabaine op de samenstelling  
van geïsoleerd oedeemvocht



# **biochemische aspecten van experimenteel hersenoedeem**

het effect van  
hypoxie en ouabaine op de samenstelling  
van geïsoleerd oedeemvocht

typewerk: G.L. Krol-Kuipers  
tekeningen en vormgeving: douwe buiter  
druk: Krips Repro, Meppel



# stellingen

1. Tijdens de ontwikkeling van experimenteel vasogeen hersenoedeem breidt de hoog-moleculaire fractie van oedeemvocht zich minder snel uit dan de laag-moleculaire fractie vanwege een remmende invloed van de grijze stof.
2. In oedemateus hersenweefsel kan een energiedeficit ten gevolge van hypoxie of intracerebraal toegediende ouabaine celzwellling met afname van de extracellulaire ruimte sterk bevorderen.
3. Volgens de Starling hypothese voor transcapillaire uitwisseling kan hypoxie of intracerebraal toegediende ouabaine naast retentie van oedeemvocht het watergehalte in het oedemateuze hersenweefsel verhogen.
4. Het gelijktijdig bepalen van de iso-enzymverdeling van LDH en CPK in plasma kan van grote betekenis zijn bij het aantonen van primaire en secundaire hersentraumata.
5. Oedeemvocht, dat zich ontwikkelt tijdens experimenteel vasogeen hersenoedeem, draagt bij tot de samenstelling van de liquor.
6. De techniek voor het isoleren van oedeemvocht uit hersenweefsel volgens de centrifugemethode levert onbetrouwbare resultaten.  
Clasen et al., in "Brain Edema", (1967) 536
7. De resultaten van Adachi doen vermoeden, dat de door hem gevonden intracapsulaire vloeistof oedeemvocht is.  
Adachi et al., Jap.J.Physiol. 24 (1971) 59
8. Het effect van glucosteroiden op hersenweefsel na experimenteel opgewekt vasogeen hersenoedeem kan, afhankelijk van de omvang en ernst van de toegebrachte laesie volledig gemaskeerd worden.  
Maxwell et al., J.Neurosurg. 34 (1971) 477
9. Therapie van hersenoedeem berust meer op ervaring dan op het besef wat het mechanisme van het oedeem is, waarop de therapie gericht zou kunnen zijn.  
Baethmann et al., Neurochir. 17 no.2 (1974)37

10. Colloid cystes van het derde hersenventrikel behoren stereotactisch te worden behandeld sinds de CT-scan is toegevoegd aan het diagnostisch potentieel.  
Bosch et al., Surg.Neurol. 9 no 1 (1978) 15
11. Het verrichten van levertransplantaties, mits op goede indicatie, behoort tot de medische handelingen, die anno 1978 in een academisch ziekenhuis mogelijk moeten zijn.
12. Invoering van een verkeerscirculatieplan van een binnenstad verhoogt de verkeersbelasting in de omringende gebieden, waardoor een kettingreactie in te nemen verkeersmaatregelen ten koste van het stedenbouwkundig karakter van deze gebieden onafwendbaar zal blijken.
13. Te veel kunstbeschouwers (b)lijken met hun oren in plaats van met hun ogen te kijken; deze vermeende kunstkenners beginnen dan ook hun kritiek met de woorden: "Het is..." in plaats van "Ik vind..."

# **biochemische aspecten van experimenteel hersenoedeem**

het effect van  
hypoxie en ouabaine op de samenstelling  
van geïsoleerd oedeemvocht

proefschrift ter verkrijging van  
het doctoraat in de geneeskunde  
aan de rijksuniversiteit te groningen  
op gezag van de rector magnificus dr. m.j. janssen  
in het openbaar te verdedigen op  
woensdag 28 juni 1978  
des namiddags te 2.45 uur precies

door JURJEN GAZENDAM  
geboren te groningen

---

PROMOTORES:

DR. K.G. GO

PROF.DR. J.W.F. BEKS

CO-PROMOTOR:

PROF.DR. M. GRUBER

Voor Christien, Joost  
Charlatte

# woord vooraf

Het experimentele deel van dit proefschrift kwam tot stand in de afdeling Experimentele Neurochirurgie (Dr.K.G.Go) van de Kliniek voor Neurochirurgie (Prof.Dr.J.W.F.Beks) der Rijksuniversiteit te Groningen. De enzymbepalingen werden verricht in het Laboratorium (Drs.E.W.Kwarts) van de Kliniek voor Inwendige Geneeskunde, de elektrolytbepalingen in het Laboratorium (Dr.A.W. Teelken) van de Kliniek voor Neurologie en de activiteitsmetingen van <sup>99m</sup>Tc-albumine door Mej.A.van Zanten in het Centraal Isotopenlaboratorium.

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan iedereen, die aan mijn academische vorming hebben bijgedragen en wel in het bijzonder zij, die mij hebben gesteund en geïnspireerd bij het tot stand komen van dit proefschrift.

Veel dank ben ik verschuldigd aan mijn promotor Dr.K.G.Go voor zijn kritische begeleiding bij het ontwerpen en uitvoeren van de experimenten. Het is voor mij een bijzonder groot voorrecht geweest om te mogen samenwerken met een man, die vooral internationaal grote bekendheid geniet om zijn ervaring en kennis op het gebied van de experimentele neurochirurgie. Mijn promotor Prof.Dr.J.W.F.Beks ben ik zeer erkentelijk voor zijn grote steun, maar bovenal voor het scheppen van de mogelijkheid tot het schrijven van dit proefschrift. Zijn niet aflatende optimisme is voor mij een grote stimulans geweest. Mijn co-promotor Prof.Dr.M.Gruber wil ik dankzeggen voor zijn aandeel in mijn biochemische opleiding en in het bijzonder voor zijn bijdrage aan dit onderzoek.

Prof.Dr.W.Schaafsma heeft tijd noch moeite gespaard mij te helpen om op de verkregen resultaten de juiste statistische methoden toe te passen.

Prof.Dr.A.M.Kroon ben ik zeer erkentelijk voor zijn opbouwende kritiek na het lezen van het manuscript.

Verder gaat mijn dank uit naar degenen, die op enigerlei wijze hebben geholpen bij het uitvoeren van de experimenten en het tot stand komen van dit proefschrift: de Heer F.Zuiderveen leverde een belangrijke bijdrage aan de operaties op onze proefdieren; de Heer J.van der Meer ontwierp en bouwde de apparatuur voor de impedantiemetingen; Mevr.T.J.de Vries-Visscher en Mej.D.A.Woldendorp verrichtten de bepalingen van de elektrolyten en de colloïd-osmotische druk; de medewerkers van Drs.E.W.Kwarts voerden de enzymbepalingen uit, waarvoor ik hen en in het bijzonder Mej.E.Hoolsema dankzeg; Mej.F.B.Bulthuis leverde een bijdrage tot het typen en verzorgen van de literatuur; de studentenassistenten van de Experimentele Neurochirurgie waren een onmisbare hulp voor mij bij het uitvoeren van de operaties; de Heer A.Schaalma heeft in zijn hoedanigheid als manuscriptredacteur het manuscript kritisch doorgenomen en van waardevolle opmerkingen en verbeteringen voorzien. Mevr.G.L.Krol-Kuipers verzorgde op zeer accurate wijze het typen van het gehele manuscript. De fotografie was in handen van de Heren M.J.Martens (Medische Fotodienst) en W.Haaïma (Centrale Fotodienst). De vormgeving van mijn proefschrift heb ik te danken aan de grote deskundigheid van de heer D.Buiter, die eveneens de tekeningen en de lay-out heeft verzorgd.

Tevens wil ik mijn ouders en schoonouders bedanken voor hun steun en vertrouwen, die zij in mij hebben geschonken gedurende mijn studie, maar bovenal tijdens mijn promotie-onderzoek. Dit geldt in het bijzonder mijn schoonvader Drs. J.H.Scholten inzake zijn aandeel in het onderzoek en in het verschijnen van mijn proefschrift.

Er is één persoon, wiens aandeel onvergelijkbaar is met die van de anderen: mijn vrouw. Vooral de laatste maanden was het voor jou, Christien, vaak erg moeilijk je humeur en de moed niet te verliezen, wanneer ik met mijn gedachten elders je het gevoel gaf niet te bestaan. Bedenk echter, dat zonder jouw hulp en opoffering mijn werk niet geleid zou hebben tot het verschijnen van "ons proefschrift".

# inhoud

inleiding	1
1 algemene beschouwing	4
1.1. inleiding	4
1.2 ruimtelijke indeling	5
1.2.1 markers	6
1.2.2 electronenmicroscopie	9
1.2.3 elektrische impedantie	9
1.2.4 voor- en nadelen der methoden	10
1.3 vloeistofsamenstelling	10
1.3.1 cerebrospinale vloeistof	11
1.3.2 extracellulaire vloeistof	14
1.3.3 intracellulaire vloeistof	15
1.4 water	16
1.4.1 inleiding	16
1.4.2 osmolaliteit	17
1.4.3 waterbeweging	18
1.4.4 verandering in de waterhuishouding	19
a BBB-beschadiging	19
b verandering energiemetabolisme	19
c osmotisch geïnduceerde veranderingen	20
1.5 barrières in de hersenen	20
1.5.1 bloed-liquor barrière	24
1.5.2 bloed-hersenen barrière	24
1.5.3 liquor-hersenen barrière	26
1.5.4 veranderingen van de barrièrepermeabiliteit	26
1.6 electrolyten	28
1.6.1 inleiding	28
1.6.2 iontransport en pompmechanisme	28
1.6.3 natrium	29
1.6.4 kalium	30
1.7 eiwitten	32
1.7.1 inleiding	32
1.7.2 globulinen	33
1.7.3 eiwit en oedeemonderzoek	34
1.7.4 enzymen	34
a creatine-fosfokinase	35
b lactaatdehydrogenase	35
1.7.5 enzymen in oedeemonderzoek	37
1.8 osmose	38
1.9 elektrische impedantie	42
1.9.1 inleiding	42
1.9.2 impedantie in oedeemonderzoek	43



<b>2</b>	<b>experimenteel hersenoedeem</b>	<b>45</b>
2.1	inleiding	45
2.2	vasogeen hersenoedeem	46
2.3	cytotoxisch hersenoedeem	53
2.4	osmotisch hersenoedeem	55
<b>3</b>	<b>materialen en methoden</b>	<b>56</b>
3.1	inleiding	56
3.2	proefopstelling	56
3.3	materialen en methoden	59
3.3.1	proedieren	59
3.3.2	ventrikeldrukmeting	59
3.3.3	koelmethode	60
3.3.4	isolering van het oedeemvocht	61
a	inleiding	61
b	naaldenplaatje en de toepassing	61
3.3.5	bepalingsmethoden op oedeemvocht	63
a	colloidosmotische drukmeting	63
b	electrolytenbepaling	64
c	lactaatdehydrogenase	65
d	creatinefosfokinase	67
3.3.6	impedantiemeting	68
3.3.7	statistiek	70
a	inleiding	70
b	gemiddelde en standaarddeviatie	70
c	toets van Friedman	70
d	toets van Kendall	71
e	toetsen van Wilcoxon	73
<b>4</b>	<b>resultaten &amp; discussie</b>	<b>75</b>
4.1	inleiding	75
4.2	serie I "controle"	78
4.2.1	COP	78
4.2.2	natrium	80
4.2.3	kalium	83
4.2.4	<sup>99m</sup> Tc-albumine	85
4.2.5	lactaatdehydrogenase	88
4.2.6	creatine-fosfokinase	93
4.2.7	liquor	97
4.2.8	conclusie en discussie	98
4.3	serie II "hypoxie"	102
4.3.1	COP	102
4.3.2	natrium	104
4.3.3	kalium	105
4.3.4	<sup>99m</sup> Tc-albumine	106
4.3.5	lactaatdehydrogenase	107
4.3.6	creatine-fosfokinase	109
4.3.7	liquor	110
4.3.8	conclusie en discussie	111

4.4	serie III "ouabaine"	114
4.4.1	COP	114
4.4.2	natrium	115
4.4.3	kalium	117
4.4.4	$^{99m}\text{Tc}$ -albumine	118
4.4.5	lactaatdehydrogenase	119
4.4.6	creatine-fosfokinase	121
4.4.7	liquor	122
4.4.8	conclusie en discussie	123
4.5	serie IV "fysiologisch zout"	125
4.5.1	COP	125
4.5.2	natrium	126
4.5.3	kalium	127
4.5.4	$^{99m}\text{Tc}$ -albumine	128
4.5.5	lactaatdehydrogenase	129
4.5.6	creatine-fosfokinase	131
4.5.7	liquor	133
4.5.8	conclusie en discussie	134
4.6	het onderlinge verband tussen de series I t/m IV	135
4.7	impedantiemetingen	136
4.7.1	inleiding	136
4.7.2	serie V "blanco"	136
4.7.3	serie VI "normaal"	138
4.7.4	serie VII "hypoxie"	140
4.7.5	serie VIII "ouabaine"	142
4.7.6	serie IX "fysiologisch zout"	144
4.7.7	het onderlinge verband tussen de series V t/m IX	146
	samenvatting	148
	summary	152
	lijst van gebruikte afkortingen	155
	literatuuroverzicht	156

# inleiding

Hersenoedeem is een abnormale toename van het vochtgehalte in hersenweefsel met als gevolg een toename van het volume van hersenweefsel. Dit kan veroorzaakt worden door een lokaal proces (o.a. traumata, ontstekingen, bloedingen) of een algemene aandoening (o.a. intoxicatie, hypertensie). Een toename van het volume van de cerebrospinale vloeistof (= CSF) in het ventriculaire systeem of van de subarachnoidale ruimte optredende bij hydrocephalus wordt echter niet gezien als een vorm van oedeem (Manz, 1974).

Ondanks intensieve onderzoeken en talrijke publikaties gedurende de laatste zeventig jaar zijn belangrijke vragen omtrent de pathogenese van hersenoedeem onbeantwoord gebleven. Het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de vorming van hersenoedeem in het algemeen en de verschillende typen oedeem in het bijzonder, is nog niet volledig bekend. Voorts is het nog niet duidelijk, of ieder type hersenoedeem zijn eigen specifieke mechanisme bezit - met voor ieder mechanisme een specifieke stimulus - of dat er sprake is van gemeenschappelijke mechanismen. Er bestaat soms nog enige verwarring door het gebrek aan een duidelijke scheiding van de eigenschappen van het proces en de klinische symptomen, die eraan worden toegeschreven.

Ten tijde van Hippocrates (460-379 v.Chr.) kende men reeds de verandering van het menselijk gedrag als gevolg van te vochtige hersenen (Clarke, 1968). Het zou tot het begin van deze eeuw duren, voordat de Duitse fysiologen het hersenoedeem als een transudaat of een exsudaat van de vaten beschreven.

Reichardt (1905) gebruikte de term "hersenooedeem" en "hersen-zwelling" (Hirñodem en Hirnschwellung) om een onderscheid te maken tussen hersenweefsel met een abnormaal verhoogd vochtgehalte, dat op het snijvlak van hersenweefsel-coupees "nat" respectievelijk "droog" voor komt.

Het gebruik van de term hersenoedeem is etymologisch juist, wanneer daarmee de toename van het hersenvolume wordt aangegeven.

Ondanks de originele betekenis van het woord - afgeleid van het Griekse οίδημα (zwelling) - bedoelt men met hersenoedeem een abnormale vochttoename in hersenweefsel. Toch is lange tijd onderscheid gemaakt tussen oedeem en zwelling als zou men te doen hebben met twee verschillende typen, nl.

- hersenoedeem, dat zich kenmerkt door een abnormale toename van vocht (ECF), in de extracellulaire (ECS), en
- hersenzwelling, gekenmerkt door een abnormale toename van vocht (ICF) in de intracellulaire ruimte (ICS).

De laatste decennia is men evenwel de mening toegedaan, dat er geen verschil mag worden gemaakt tussen zwelling en oedeem, maar eerder beide fenomenen te beschouwen als verschillende stadia voor hetzelfde proces (Stewart-Wallace, 1939; Luse & Harris, 1960; Katzman 1973). Zolang de kennis omtrent de verdeling van het vocht tussen de ECS en de ICS onvoldoende is, kunnen beide termen voor één en hetzelfde begrip gebezigd worden.

Een van de oorzaken die een remmende invloed hebben gehad op de ontwikkeling van het onderzoek naar hersenoedeem is, dat vele wetenschappelijke onderzoekers experimenteel hersenoedeem hebben opgewekt door gebruik te maken van een groot aantal uiteenlopende methoden. Experimenteel hersenoedeem is onder te verdelen in drie hoofdtypen (zie hoofdstuk 2). Doordat bij de drie typen met verschillende parameters wordt gewerkt, is een onderlinge vergelijking zeer moeilijk, dan wel onmogelijk. Dit is niet alleen het gevolg van de complexiteit en de omvang van het probleem, maar tevens van een gebrek aan uniformiteit in terminologie en van standaardisatie van de gevolgde procedure bij experimenteel opgewekt hersenoedeem in verschillende proefdieren. Hierin is de laatste jaren enige verbetering gekomen. Nieuwe technieken zoals elektronenmicroscopie, radioactieve isotopen, en verbeterde chemische analysemethoden hebben ertoe bijgedragen, dat localisatie, distributie van hersenvocht, uitbreiding van hersenoedeem, ultrastructuur van hersenweefsel en microchemische veranderingen voor een groot deel benaderd konden worden. Bij experimenteel opgewekt hersenoedeem meent Katzman (1973), dat de conclusies, die getrokken kunnen worden uit een onderzoek aan hersenen van een proefdier (vnl. muis, rat, kat, hond en aap) tot op zekere hoogte van toepassing zijn op menselijke hersenen.

Een belangrijke bijdrage tot het totale hersenoedeemonderzoek is het symposium te Wenen in 1965 (Klatzo en Seitelberger, 1967). Van evenveel importantie is de klassificatie van hersenoedeem door Klatzo (zie hoofdstuk 2). Het meest voorkomende type, dat in experimenteel onderzoek op velerlei manieren tot stand kan worden gebracht, is het vasogene hersenoedeem.

In dit onderzoek worden een aantal parameters nader beschouwd aangaande de cerebrale vochthuishouding in relatie tot hersenoedeem en wel een experimenteel vasogeen hersenoedeem ten gevolge van een koude laesie. Hoofdstuk 1 omvat een algemene beschouwing over hersenen en haar eigenschappen: de ruimtelijke indeling en de vloeistofsamenstelling der drie hoofdcompartimenten, het hersenwater, de barrières, de elektrolyten en de eiwitten. Eveneens worden de osmotische eigenschappen en de theorie van de impedantie kort besproken. Hoofdstuk 2 handelt over het experimentele hersenoedeem en de klassificatie ervan, namelijk het vasogene, het cytotoxische en osmotische hersenoedeem. Hierbij zal het zwaartepunt liggen bij het vasogene type.

Het vasogene type wordt gekenmerkt door exudatie van bloed-plasmafracties in het gelaedeerde gebied als gevolg van een lokaal functieverlies van de bloed-hersen barrière (BBB). Het exsudaat breidt zich voornamelijk uit in de witte stof (Go, 1967). Hierbij treedt een complex van veranderingen op. Een van de belangrijkste veranderingen is de verhoging van de BBB-permeabiliteit. Hierdoor kunnen plasma-eiwitten via de perivasculaire ruimte in de cortex doordringen tot de extracellulaire ruimte (ECS) van de dieper gelegen witte stof. Een verhoogde ICP kan een lokale ischaemie tot gevolg hebben, hetgeen het cellulair metabolisme fataal kan aangrijpen. Een verstoring en/of beschadiging van de structuur van het celmembraan met het daaraan gekoppeld transportmechanisme zou mogelijk cytoplasmatisch materiaal in de ECF kunnen doen uit treden. Dit zou tot een verdere verhoging van de colloidosmotische druk (COP) en ook van de intracraniële druk (ICP) kunnen leiden.

Dit onderzoek is gericht op het verkrijgen van een beter begrip van de veranderingen van een aantal parameters bij een experimenteel opgewekt vasogeen hersenoedeem onder verschillende omstandigheden, zoals hypoxie en intracerebraal geïnjecteerde ouabaine. Samengevat kunnen de veranderingen van de volgende parameters in de tijd vervolgd worden:

1. de colloidosmotische druk van liquor en geïsoleerd hersenoedeemvocht als uitdrukking van een veranderde BBB-permeabiliteit, maar vooral voor cellulaire beschadiging,
2. de elektrolytenconcentratie in liquor en geïsoleerd hersenoedeemvocht als maat voor een veranderde BBB-permeabiliteit, maar vooral voor cellulaire beschadiging of aantasting van het mechanisme van het cellulaire transport,
3. enzymactiviteit in geïsoleerd hersenoedeemvocht, plasma, en liquor als maat voor een cellulaire beschadiging, stofwisselingsstoornissen en voor een uitvloed van hersenspecifieke enzymen naar de bloedbaan,
4. de ventrikeldruk (CSFP) als representant van de intracraniële druk (ICP),
5. de specifieke impedantie als maat voor de relatieve verdeling van de ECS en de ICS en als maat voor de verandering van hersenoedeemvocht in deze beide compartimenten, alsmede de uitbreidingssnelheid van het oedeemvocht.

Bovengenoemde parameters zijn van belang voor de uitbreiding en samenstelling van oedeemvocht tijdens de ontwikkeling van een vasogeen hersenoedeem. Mogelijk kunnen de parameters dienen tot het verkrijgen van enig inzicht in de terugkeer naar een - gedeeltelijk - herstel. Hiervoor zijn het herstel van de BBB en de resorptie van het oedeemvocht van fundamenteel belang.

# 1 algemene beschouwing

## 1.1 inleiding

Een van de belangrijkste factoren die de homeostase van de hersenen in zijn algemeenheid bepaalt, is de starheid van haar omhulsel - het cranium - en de daaruit voortvloeiende inflexibiliteit van het systeem voor volumeveranderingen. Het intracraniële volume kan worden onderverdeeld in drie hoofdcomponenten, te weten

- hersenweefsel
- liquor
- bloed

Aristoteles (384 - 322 v.Chr.) geeft in zijn *Historica animalium* reeds een uitvoerige beschrijving van de menselijke en dierlijke hersenen. Hij spreekt daar over het koude, bloedeloze weefsel, de vaten en over de kleine holtes (dit zijn de ventrikels); het geheel is omsloten door een dik membraan, dat strak over de hersenen is gespannen (Clarke, 1968).

Het zou tot het begin van de vorige eeuw duren, voordat de Monroe-Kellie doctrine ons leert, dat niet alleen het totale volume van de hersenen, maar ook de verhouding der volumina van de drie voornoemde componenten zeer constant zijn (Clarke, 1968; Go, 1970).

Ryder (1953) legde als eerste het onderlinge verband vast tussen de volumina van de liquor, de bloedvaten en de hersenmassa in relatie tot de intracraniële druk. Dit verband kan mathematisch in de volgende formule worden weergegeven (Ryder, 1953; Ishii, 1967; Gerber, 1974).

$$V_{ic} = V_{br} + V_{bl} + V_{csf} (+ V_l) \quad (1)$$

$V_{ic}$  = totaal intracraniële volume

$V_{br}$  = volume van het hersenweefsel

$V_{bl}$  = volume van het bloed

$V_{csf}$  = volume van de liquor

$V_l$  = pathologische volumevergroting, indien aanwezig.

Gerber et al (1974) geeft een goed overzicht van de oorzaken van intracraniële hypertensie aan de hand van bovenstaande formule.

Tussen  $V_{br}$ , en  $V_{csf}$  zijn de compensatoire volumeveranderingen mogelijk zonder een meetbare verandering van  $V_{ic}$ . Deze veranderingen moeten bijzonder klein zijn om geen stijging of daling van  $V_{ic}$  te kunnen registreren. Wordt een kritieke drempelwaarde overschreden, dan zal de intracraniële druk sterk stijgen. Deze drempelwaarde wordt o.a. bepaald door de elas-

ticiteit en compliantie (samendrukbaarheid) van de drie hoofdcomponenten. Een duidelijk voorbeeld van compensatoire volumeveranderingen is een volumevergroting van één of meerdere componenten als gevolg van een relatieve osmolaliteitsverhoging in de hersenen. Wanneer het osmotisch gradiënt bij een acute osmolaliteitsverandering, dat experimenteel kan worden opgewekt tussen hersenen en bloed, groter wordt dan 35 mOsm, dan zal er een verandering in weefselvolume plaatsvinden. De kritieke drempelwaarde is derhalve overschreden (Stern, 1964; Arieff, 1972; Pappius, 1975).

Het meten van veranderingen in het hersenvolume bij experimenteel geïnduceerde verhogingen en verlagingen van  $V_{ic}$  is ontwikkeld door Elliot en Jasper (1949). Aangenomen, dat veranderingen in hersenvolume het gevolg zijn van een toe- of afname van het watergehalte, dan is het meten van het percentage droog gewicht een maat voor de totale volumeverandering.

$$\text{percentage drooggewicht} = \frac{\text{mg. droog weefsel}}{\text{mg. vers weefsel}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{percentage water} = 100\% - \text{percentage drooggewicht} \quad (3)$$

$$\text{zwellingspercentage} = \left( \frac{p - p_1}{p_1 - q} \right) \times 100\% \quad (4)$$

$p$  = percentage droog gewicht normaal weefsel

$p_1$  = percentage droog gewicht oedemateus weefsel

$q_1$  = percentage droog gewicht opgenomen vloeistof

$q = 0$  voor water,  $p = 11$  voor plasma ultrafiltraat (Pappius, 1974).

Voor een duidelijk inzicht in de problematiek van hersenoedeem is het van belang te weten hoe de normale ruimtelijke verdeling en de grootte van de voornoemde hersencomponenten is met de daarbij behorende vloeistofsamenstelling.

## 1.2 ruimtelijke indeling

In 1.1 werd gesproken over de drie hoofdcomponenten. De schiedelinhoud kan men onderverdelen in drie daarmee samenhangende hoofdcompartimenten:

- hersenweefsel
- liquorruimte
- vaatvolume.

In werkelijkheid bestaan de hersenen uit een uitzonderlijk hoog aantal compartimenten, afhankelijk van de aangelegde criteria. Men kan de hersenen indelen op grond van bekende anatomische structuren zoals witte stof en cortex, of van celtype zoals vaatendotheel, neuronen en gliacellen. Ondanks deze grote heterogeniteit heeft men het voornoemde macroscopische drie-compartimentensysteem op praktische gronden laten preva-

leren boven een multicompartimentensysteem in de beschouwingen over intracraniële drukverhoudingen.

De ruimtelijke indeling en volume van de ECS en ICS kan worden bepaald met behulp van

- markers
- elektronenmicroscopie
- elektrische impedantie

## .2.1 markers

Het volume van water in hersenweefsel, dat aanwezig is onder steady state\*omstandigheden voor de verdeling van een meestal intraveneus toegediende marker is een maat voor het volume van het vloeistofcompartiment van het te onderzoeken hersenweefsel. De te gebruiken stof als marker moet aan een aantal voorwaarden voldoen, wil de verdelingsruimte van de marker overeenkomen met de ECS.

De belangrijkste zijn:

- de marker moet snel de capillairwand kunnen passeren,
- de marker mag niet of nauwelijks door het celmembraan de cel binnendringen,
- de marker mag niet gemetaboliseerd of geneutraliseerd worden,
- de marker moet kunnen equilibreren met de gekozen referentievloeistof (d.i. meestal de CSF).

De marker space wordt weergegeven in percentages:

$$\text{marker space} = \frac{\text{concentratie marker in weefsel}}{\text{concentratie marker in referentievloeistof}} \times 100\%$$

Het binnendringen van markers vanuit de bloedbaan naar de hersenen blijkt in praktijk een traag proces. Het bereiken van een steady state concentratie van een marker wordt pas na vele uren bereikt, terwijl dit in de spieren al binnen enkele minuten bereikt wordt (Davson, 1967).

Natrium en chloor bereiken in de CSF hogere concentraties dan in plasma door het actieve secretieproces in de plexus choroideus bij de CSF-productie. Intraveneus toegediende markers kunnen in de CSF ook lagere concentraties bereiken dan in plasma wanneer zij door afvoer, diffusie naar de hersenen of door actief transport sneller uit de CSF verdwijnen dan zij

---

(\* In termen van de thermodynamica worden levende organismen als open systemen beschouwd. De voorwaarden voor een open systeem in steady state is, dat de transportsnelheid van stoffen en energie van de omgeving naar het systeem toe even groot is als de transportsnelheid van stoffen en energie van het systeem naar de omgeving toe. Een levend organisme, dat in evenwicht schijnt te zijn, met zijn omgeving, bevindt zich in werkelijkheid in een zgn. steady state.



in de liquorruimte binnendringen vanuit het bloed. Dit geldt voor o.a. thiocynaat en jodium (Van Harreveld, 1966). Het gevolg is, dat onder steady state omstandigheden een concentratiegradiënt zal ontstaan tussen de CSF en het bloed. Naast een éénmalige intraveneuze toediening (Reed, 1964; Fenske, 1973) of door incubatie van de hersenplakjes (Hu, 1973; Fishman, 1974; Laasko, 1976) is eveneens gebruik gemaakt van ventriculo-cisternale, de ventriculolumbale en de sub-arachnoidale perfusietechniek (Fenske, 1973; Katzman, 1973; Fenstermacher, 1974 en 1975). De laatstgenoemde technieken hebben als groot voordeel dat de concentratie van de marker in de referentievloeistof constant wordt gehouden. Voor het bepalen van het volume der vloeistofcompartimenten is gebruik gemaakt van een groot aantal markers. De belangrijkste zullen hier kort worden behandeld.

- <sup>24</sup>Natrium en <sup>36</sup>Chloor. Van deze ionen werd aangenomen, dat de marker space nagenoeg gelijk was aan de ECS vanwege de snelle verspreiding in de hersenen. Hierbij dient wel te worden opgemerkt, dat beide ionen ook intracellulair voorkomen (zie tabel IV). Een correctie op de berekening van de ECS is derhalve noodzakelijk. Volgens Van Harreveld (1966) zou zonder correctie de ECS in konijnhersen 27 of 31% zijn (met CSF resp. plasma dialysaat als referentie); na correctie berekende hij de ECS op 21-24%.

Tabel I.

<sup>24</sup> Natrium (gecorrigeerd)	<sup>36</sup> Chloor (gecorrigeerd)	referentie
24	21 - 24	Van Harreveld 1966 <sup>*</sup>
	28,3	Arieff 1972 <sup>*</sup>
	30	Reed 1964 <sup>+</sup>

Extracellulaire ruimte uitgedrukt in %, berekend met behulp van <sup>24</sup>Na en <sup>36</sup>Cl voor konijne-<sup>\*</sup> en ratteherenen.<sup>+</sup>

- Thiocynaat. Thiocynaat heeft als voordeel, dat het uiterst langzaam uit het lichaam wordt uitgescheiden en zich sneller in de ECS verspreidt dan andere bekende markers. Pappius vond voor de cortex 29 - 38% en voor de witte stof 22 - 39% voor de ECS in katteherenen (Katzman, 1973).
- <sup>131</sup>Jodium. Het <sup>131</sup>I heeft dezelfde voordelen als genoemd zijn voor het thiocynaat. De ECS voor <sup>131</sup>I is volgens Ahmed (1969) 22,5% in konijnhersen.
- <sup>35</sup>S in SO<sub>4</sub>. Gelabeld sulfaat - intraveneus toegediend - levert een <sup>4</sup>ECS van 16 - 24% in katteherenen. Bij het toepassen van een ventriculocisternale perfusie - om een gradiënt tussen het plasma en de CSF uit te sluiten - is het percentage echter 8 - 12%. Hierbij is het plasma als refe-

rentievloeistof gebruikt (Fenske, 1973). Met behulp van dezelfde perfusie techniek berekende Baethmann (1975) een ECS van 16% in rattehersenen.

- Sucrose. Intraveneuze toediening resulteert in een slechte distributie. De ECS bedraagt niet meer dan 3%. <sup>14</sup>C gelabelde sucrose, intraveneus toegediend, gecombineerd met een ventriculocisternale perfusie doet de ECS stijgen tot 9% in konijnehersenen (Oldendorf, 1967). Met behulp van de zogenaamde diffusieprofieltechniek vindt Fenstermacher (1970) maar liefst een ECS van 19,8%! \*
- Inuline. De resultaten van inuline zijn nagenoeg identiek aan die van sucrose. Intraveneus (i.v.) toegediende inuline levert een ECS op van 2 - 5%, terwijl dit percentage stijgt bij een gecombineerde toedieningsvorm van i.v. en ventriculocisternale perfusie stijgt tot 14% (Katzman, 1973). De door Fenstermacher (1970) toegepaste diffusieprofieltechniek geeft een ECS van 18,4% aan.

Iedere gebruikte stof als marker heeft zijn voor- en nadelen. Van bijvoorbeeld <sup>24</sup>Na, <sup>36</sup>Cl en thiocynaat is bekend, dat zij ook intracellulair voorkomen. Dit impliceert, dat de gevonden waarden voor het bepalen van de ECS te laag zijn.

plasma      ➡      ECS      ➡      ICS

Voorts wordt gelabeld sulfaat ingebouwd teruggevonden in metaboliëten. Gelabeld sucrose en inuline zijn in zenuwcellen aangetroffen. Thiocynaat wordt actief uit het CSF getransporteerd, waarbij het transportmechanisme verzadigd kan raken. Thiocynaat en jodium binden zich aan plasma eiwitten. Sulfaat, sucrose en inuline worden door het lichaam uitgescheiden, zodat nephrectomie noodzakelijk is om equilibratie te bereiken. Dit laatste punt is trouwens een probleem, dat zich bij nagenoeg alle markers voordoet. Om deze onvolkomenheid te omzeilen wordt de laatste jaren meer en meer gebruik gemaakt van de voornoemde diffusieprofieltechniek, omdat voor de toepassing van deze techniek als enige belangrijke voorwaarde geldt, dat voor de te gebruiken marker een goede diffusie vereist is en de marker niet aan een transportsysteem is gebonden.

---

(\*) met een diffusieprofieltechniek wordt niet de instelling van een evenwicht afgewacht. De ECS wordt met behulp van extrapolatie berekend.

## 1.2.2 elektronenmicroscopie

Toen in de vijftiger jaren de elektronenmicroscopie zijn intrede deed in het hersenonderzoek bleken grote tegenstellingen te ontstaan tussen hen, die zich van de elektronenmicroscopie bedienden en de andere onderzoeker omtrent de ware grootte van de ECS. Deze morfologen vonden een zeer kleine ECS (Ishii, 1962) die aan de hand van de foto's werd berekend op  $\pm 5\%$  (Horstmann, 1959; Davson, 1967). Hierbij dient wel vermeld te worden, dat de ECS voornamelijk bepaald is in de cortex. Bovengenoemde percentages voor de ECS van het totale weefsel zijn in tegenspraak met de grootte van de ECS, bepaald met behulp van natrium en chloor (20 - 30%). Men beschouwde vaak de ECS als het specifieke neuronale weefsel; de ECS werd gezien als de overige ruimte, die niet tot de ECS behoorde (bijv. interstitiële vloeistof en bloed). Van de grootte van de intercellulaire ruimte in de cortex lopen de waarden niet ver uiteen. De extracellulaire spleten - aan de hand waarvan men de ECS berekende - bedragen ongeveer 100 - 200 Å (Luse en Harris, 1960; Ishii, 1962; Aleu, 1963; Gonatas, 1963; Lee, 1966). Voor de witte stof vindt Lee (1966) extracellulaire spleten van 800 Å of meer. Dit is in overeenstemming met de door Raimondi (1962) gevonden waarden met evenwel een grote spreiding nl. 200 - 800 Å. Van Harreveld (1966) vindt met de verbeterde fixatiemethoden (m.b.v. vries substitutie) wel lagere waarden nl. 100 - 200 Å. Na invoering van nieuwe fixatie technieken bleek de ECS groter te zijn dan de morfologen hadden berekend. Gesteld kan worden, dat de ECS zeer labiel is en sterk kan wijzigen onder veranderde omstandigheden (fixatieprocedure en dehydratie). Het weefsel kan tijdens fixatie zowel krimpen (als de fixatievloeistof een te hoge osmolaliteit bezit) als zwellen (als de osmolaliteit van de fixatievloeistof onder een bepaalde kritische waarde ligt) of wanneer de fixatieprocedure te lang duurt (Van Harreveld, 1966; Brightman en Go persoonlijke mededeling). Zij, die zich tegenwoordig bedienen van de elektronenmicroscopie passen een correctie toe bij hun berekeningen van de ECS voor het krimpen van het weefsel door fixatie. Zo vindt Bakay (1975) een ECS van 7 - 10% in de witte stof van kattenhersen en hetgeen na extrapolatie neerkomt op 15 - 20%.

## 1.2.3 elektrische impedantie

Bij de beoordeling van de ECS met behulp van elektrische impedantiemeting kan het weefsel beschouwd worden als een suspensie van de cellen in een geleidend medium. Bij de specifieke impedantie van hersenweefsel maakt men gebruik van de deelname van de extracellulaire ionen in de geleiding van de door de ECF gevoerde stroom. Bij een wisselspanning met een lage frequentie wordt de stroom voornamelijk gedragen door de in de ECF voorkomende ionen; de deelname van intracellulaire ionen aan het stroomtransport wordt zeer sterk geremd door de isolerende

eigenschappen van het celmembraan (Baethmann, 1973).

In deze formulering is de verhouding ECS/ICS ook een parameter voor de specifieke impedantie van het weefsel. Van Harreveld (1966), een grote promotor van deze techniek, vond voor de cerebrale cortex van de kat een specifieke impedantie van ongeveer 200  $\Omega$ .cm. Dit komt ongeveer overeen met een ECS van 25%. Nicholson (1965) berekende de ECS in de witte stof van kattenhersen op ongeveer 10%. In 1.9 - impedantie - zal uitvoeriger op deze theorie worden ingegaan.

#### 1.2.4 voor- en nadelen der methoden

Vele conclusies zijn getrokken uit de resultaten van experimenten, die vaak berusten op theoretische veronderstellingen. De omstandigheden, waaronder de experimenten werden uitgevoerd konden niet altijd op hun deugdelijkheid worden getoetst. Iedere methode voor het bepalen van de ECS heeft zijn technische en theoretische onvolkomenheden. In 1.2.1 zijn nadelen van enkele markers genoemd. Bijna geen enkele stof voldoet aan alle gestelde voorwaarden, zoals die in het begin van 1.2.1 zijn genoemd. De spreiding van de gevonden waarden voor de ECS is bijzonder groot: 2 - 30%. Zuiver technische onvolkomenheden beïnvloeden de metingen van de ECS met behulp van de elektronenmicroscopie. Tegenwoordig worden de vroeger gevonden waarden (+ 5%) als te laag beschouwd als gevolg van o.a. krimp, zwelling of dehydratie gedurende de meeste fixatieprocessen (zie 1.2.2). Impedantiemetingen kunnen afhankelijk zijn van de meetinrichting en plaatselijke weefselstructuur van de witte stof of de cortex.

Recente onderzoeken met inuline (zie 1.2.1) zijn van dien aard dat ze o.a. door Fishman (1975) als een betrouwbare maat worden beschouwd voor het bepalen van de ware ECS.

### 1.3 vloeistofsamenstelling

In 1.1 is reeds ingegaan op de drie hoofdcomponenten, waarvan de volumina zijn samengevat in de formule van Ryder (1953). De samenstelling van de in de compartimenten aanwezige vloeistof en de daarin opgeloste stoffen is van essentieel belang voor het uitvoeren van de normale functies van de hersenen; het is eveneens van belang voor een beter begrip van oorzaak en gevolg bij pathologische processen in de hersenen. Er bestaat een relatie tussen de vloeistoffen in de liquorruimte de extracellulaire ruimte, alsook tussen het bloed en de CSF en ECF. Over dit laatstgenoemde punt zal in hoofdstuk 1 punt 5 nader worden ingegaan. Wij zullen ons hier beperken tot de oorsprong en samenstelling van de CSF, de ECF en in iets mindere mate de ICF.

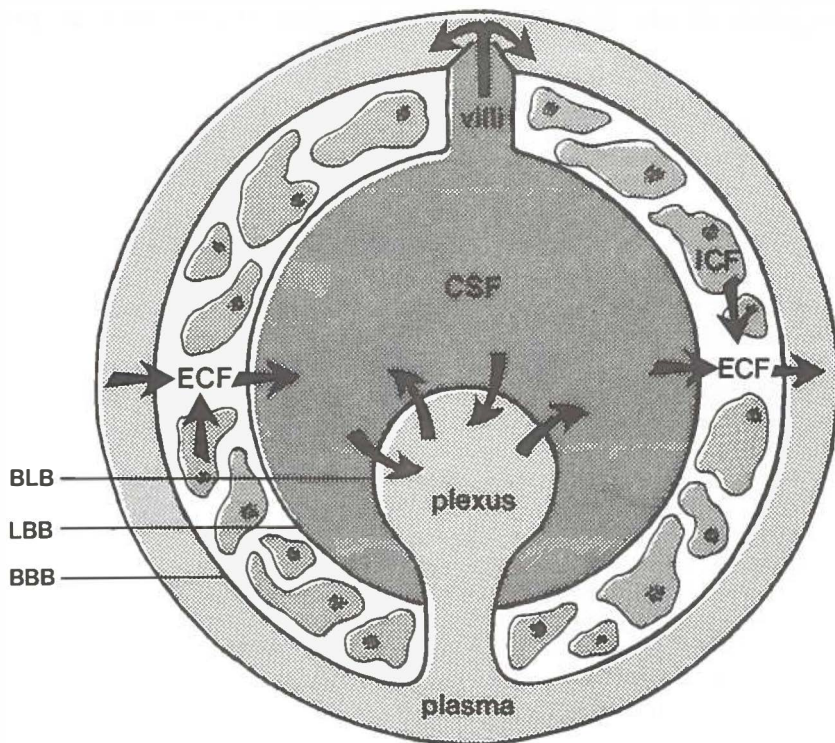


Fig. 1. Schematische voorstelling van de hersencompartimenten, -vloei-  
stoffen en -barrières. ECF = extracellulaire vloeistof; ICF = intracel-  
lulaire vloeistof; CSF = cerebrospinale vloeistof.  
Voor de barrières BBB, BLB en LBB zij verwezen naar fig. 2.

### 1.3.1 cerebrospinale vloeistof

Reeds vanaf de vorige eeuw hebben onderzoekers aangetoond dat de liquor - ofwel de cerebrospinale vloeistof - constant vernieuwd wordt (Cserr, 1971; Katzman, 1973; Fisher, 1975). De belangrijkste plaats, waar de CSF gevormd wordt, is de plexus choroideus. Naast een lage CSF-produktie in de derde ventrikel bestaat er een extrachoroidale CSF-aanmaak, die ongeveer 35% van de totale CSF-produktie uitmaakt (Pollay, 1975). Volgens Milhorat (1971) doet de choroidale plexectomie de CSF-produktie met 33 - 40% afnemen. Recente elektronenmicroscopische onderzoeken tonen aan dat de plexus choroideus een secretieorgaan is. De villi choroideus bevatten zgn. "tight junctions" tussen de cellen (voor de betekenis van "tight junctions" zij verwezen naar 1.5). Door deze afsluiting tussen cellen kunnen hoog-moleculaire stoffen niet vanuit de bloedbaan de ventrikelruimte binnendringen; in verwaarloosbare hoeveelheden kunnen die stoffen middels pinocytose in de CSF terechtkomen. De gesecerneerde CSF stroomt via de twee latera-

le ventrikels, de derde en vierde ventrikel en door de foramina van Magendie en van Luschka naar de subarachnoidale ruimte. Vanuit de subarachnoidale ruimte wordt CSF gedraineerd via de villi arachnoidales naar de veneuze sinus. Door de sluiswerking zou slechts éénrichtingsverkeer mogelijk zijn. Hiervoor geldt uiteraard dat de druk in de liquorruimte groter is dan de veneuze druk (zie figuur 1). In tegenstelling tot Fisher (1975) meent Davson (1967) dat de cilia op de ependymcellen en de arteriële pulsaties rondom de liquorruimte, de CSF voortstuwt. De voornoemde pulsaties, die zich in de liquorruimte voortplanten zijn manometrisch goed meetbaar. Aannemelijk lijkt, dat deze twee mechanische invloeden op de inhoud van de liquorruimte de CSF helpen mengen. Obstructie van het foramen van Monroi, de aqueductus Sylvii, de extracerebrale liquorwegen, resorptiestoornissen in de cerebrale sinus, afsluiting van de foramina van Magendie en Luschka verhinderen het afvloeien van CSF en heeft vergroting van de ruimten proximaal van de obstructie tot gevolg (Ulrich 1975). De totale liquorcirculatie is enigermate te volgen met behulp van isotopencisternografie.

Voor het berekenen van de CSF-produktiesnelheid zijn verschillende methoden ontwikkeld, onder andere de open drainage en de manometrische methode, die klinisch bruikbaar zijn. De verschillende perfusietechnieken zijn voor experimenteel onderzoek uitermate geschikt vanwege de grote nauwkeurigheid en de informatie, die wordt verkregen voor het bepalen van het absorptief vermogen van het hersenweefsel.

Tabel II

Specie	Produktiesnelheid (ul/min)	Referentie
Mens	320 - 520	Pollay 1975
	350	Siegel 1976
Kat	22	Katzman 1973
	25	Hochwald 1974
	23,5	Hochwald 1976
	20	Cserr 1971
	17,1	Bourke 1970
	15 - 21	Pollay 1975
Rat	2,2	Pollay 1975

CSF-produktiesnelheid (ul/min) voor de mens, de kat en de rat.

De secretie van CSF kan verlaagd worden door middel van onder andere ouabaine, dexamethasone, acetazolamide, dinitrofenol, hypothermie en hypo-osmolaire oplossingen, terwijl een secretieverhoging kan worden bevorderd met chloroform, ether, alcohol, atropine, amylnitraat en pilocarpine (Brøndsted, 1970a, 1975b; Cserr, 1971; Wright, 1972; Katzman, 1973; Hochwald, 1974; Wright, 1974; Pollay, 1975).



Vanuit de ventrikel- en subarachnoidale ruimte is een uitwisseling van stoffen mogelijk tussen de CSF en ECF door het endym en de pia mater. Deze uitwisseling is in beide richtingen mogelijk. De plexus choroideus is in staat stoffen actief naar de bloedbaan te transporteren (Cserr, 1971). Hieruit volgt, dat de CSF - op verschillende plaatsen in haar circulatiesysteem gemeten - geen constante samenstelling bezit (zie tabel III). Bito (1965) toonde deze locale variaties aan, gemeten in de ventrikels, cisterna magna en subarachnoidale ruimte.

De samenstelling verschilt daarin van plasma, dat de CSF zeer eiwitarm is (zie tabel III en X). De ionenconcentratie van de CSF is zeer constant en is zodanig samengesteld dat het geen ultrafiltraat van het plasma is. Vele CSF-fractionen zijn onafhankelijk van de plasmaconcentraties. Het nauwkeurig functioneren van mechanismen, om de CSF-samenstelling zo constant mogelijk te houden, is van wezenlijk belang. Zo zijn de receptoren van het ademhalingscentrum, dat dicht bij de vierde ventrikel ligt, uiterst gevoelig voor pH-veranderingen. De elektrolytconcentraties zijn aan nauwe grenzen gebonden in verband met de belangrijke prikkelbaarheids- en geleidingsfunctie van de neuronen. Elektrolyten worden actief getransporteerd in de plexus door het ouabaine-gevoelige, Na-K- afhankelijk pompmechanisme (Wright, 1974). Het natriumtransport is - bij de kat althans - van

Tabel III

	CSF	cist.magna	plexus	plasma	Referentie
Na <sup>+</sup>		158	158	151	Cserr 1971
		158		147	Vogh 1975
K <sup>+</sup>	2,86				Husted 1976
		2,69	3,28	3,30	Cserr 1971
		2,8		3,8	Vogh 1975
Ca <sup>++</sup>		1,50	1,67	1,83	Cserr 1971
	3,00			5,24	Katzman 1973
Mg <sup>++</sup>		1,33	1,47	0,95	Cserr 1971
	1,89			1,75	Katzman 1973
Cl		144	138	136	Cserr 1971
		134		115	Vogh 1975
HCC <sub>3</sub>		18,3	25,6	17,2	Cserr 1971
	16,4			16,4	Katzman 1973
pH	7,35			7,37	Cserr 1971
	7,44			7,46	Frei 1973
pCO <sub>2</sub>	31,6			26,6	Katzman 1973
	31,6			28,9	Frei 1973
Osmol	289			289	Davson 1976
eiwit	25			6500	Davson 1967

Samenstelling van de CSF van de kat. Ionenconcentratie uitgedrukt in meq/l; pCO<sub>2</sub> in mmHg; eiwit in mg%.

het bloed naar de CSF tegen een elektrochemisch potentiaal gradiënt in. Chloorionen zouden passief volgen (Cserr, 1971). Volgens Bourke (1970) bestaat er echter wél een transportmechanisme voor de chloorionen.

Verhoging van  $(K^+)$  van 2 naar 12 meq/l doet de  $(K^+)$  nauwelijks <sup>plasma</sup> veranderen (zie ook 1.6).

De CSF kan worden beschouwd als een spoelvroestof voor het hersenweefsel. Voedingsstoffen worden via de plexus en de ventrikelruimte aangevoerd en uitgewisseld tegen afvalproducten van het hersenweefsel. Deze uitwisseling geschiedt door het ependym en de pia mater (zie figuur 1). De bloed-hersen barrière beschermt de hersenen tegen fluctuaties van stoffen, die in het bloed voorkomen (zie 1.5). Volgens Fischer (1975) dient de CSF voor het handhaven van het interne milieu en werkt het stabiliserend op de neurochemische factoren (zoals de zuurbasis balans). Men kan aan de CSF ook een mechanische functie toekennen, namelijk als stootkussen voor het hersenweefsel.

### 1.3.2 extracellulaire vloeistof (ECF)

De interstitiële of extracellulaire vloeistof is samengesteld uit stoffen, die enerzijds afkomstig zijn uit het bloed anderzijds uit de CSF. De stoffen komen via de BBB en de LBB respectievelijk via de pia mater en het ependym in de ECS terecht. De samenstelling van de ECF wordt beschouwd als nagenoeg identiek aan die van de CSF (Davson, 1967; Cserr, 1971; Gardner, 1972; Fenstermacher, 1975). Gardner (1972) stelt, dat de hersenen een orgaan zijn met een veelvoudige epitheel laag en met het plexusepitheel als basaal-membraan. Om die redenen zou de CSF in feite op te vatten zijn als een interstitiële vloeistof.

De ECF van het hersenweefsel is echter nooit geïsoleerd, zonder dat bedenkingen zijn geuit over de gevolgen van de isoleringsprocedure (Clasen, 1965; Van Harreveld, 1966; Fenske, 1973). Clasen (1965) gebruikte een centrifugemethode om oedeemvloeistof te isoleren uit hond hersenen na toediening van een koude laesie. Zijn gevonden waarden voor natrium en chloor zijn laag, nl. 123,4 resp. 86,7 meq/l (vergelijk tabel III voor de CSF-waarden van de kat), terwijl de kaliumconcentratie erg hoog was nl. 15 meq/l. Ling (1975) paste de centrifugemethode toe op spierweefsel van de kikker. Hij tracht na  $Na^{22}$ -incubatie te bewijzen, dat met deze methode alleen ECF en geen mengsel van ECF en ICF geïsoleerd kan worden. Het niet meer toepassen van de centrifugemethode na proeven van Clasen (1965) doet vermoeden, dat onderzoekers weinig heil zien in het gebruiken of verfijnen van deze methode in experimenteel hersen-onderzoek.

Bradbury en Davson (1965) hebben de  $(K^+)$  berekend door aan te nemen, dat de transportcoëfficiënt voor  $CSF \rightarrow ECS$  gelijk is aan  $ECF \rightarrow CSF$ . Zij vinden  $(K^+)_{ECF} = 2,8$  meq/l in



konijnehersenen. Vyšcocy (1972) meet de  $(K^+)_{ECF}$  met behulp van een ionselectieve elektrode. Bij rattehersenen vindt hij  $2,98 \pm 0,07$  meq/l. Kirschner (1975) past dezelfde methode toe op kattenhersenen; hij meet  $(K^+)_{ECF} = 3,4 \pm 0,2$  meq/l. Prince (1975) bepaalt op dezelfde wijze voor kattenhersenen de  $(K^+)_{ECF}$  op  $3,25$  meq/l. De waarden, gevonden in kattenhersenen, komen goed overeen met de  $(K^+)_{ECF}$ , zoals vermeld in tabel III. Van de overige ionen en opgeloste stoffen in de ECF is volgens ons in de literatuur niets bekend.

### 1.3.3 intracellulaire vloeistof (ICF)

Afgezien van het feit dat de hersenen een groot aantal totaal verschillende celtypen bevatten met voor ieder type zijn specifieke morfologische en fysiologische eigenschappen, zou het te ver voeren de samenstelling van de ICF voor ieder type te behandelen. Wij zullen ons alleen beperken tot die aspecten, die in direct verband staan met dit onderzoek.

Het is algemeen bekend, dat de cel eiwitrijk is, waarbij een deel zich in opgeloste toestand bevindt in de fractie, die wordt aangeduid als de ICF. Voor ons onderzoek zijn alleen hersenspecifieke eiwitten, zoals het CPK<sub>BB</sub> iso-enzym of de iso-enzymverdeling van LDH van belang (zie 1.7). De verdeling van de elektrolyten over de ECF en de ICF geeft aan, dat hier sprake is van een actief pompmechanisme voor het in stand houden van een gradiënt over het celmembraan (zie 1.6.2). Het slecht functioneren of blokkeren van het pompmechanisme doet natrium de cel instromen en kalium de cel uitstromen. Dit verschijnsel is van belang bij de beoordeling van de effecten, die kunnen optreden, wanneer de patient of het proefdier in een verslechterde conditie komt te verkeren tijdens een hersenoedeem.

Tabel IV

	ECF	ICF	Referentie
Natrium	150	25	Van Harreveld (1966)
	148,4	20.2 - 45.3	Katzman (1973)
Kalium	5	150	Van Harreveld (1966)
	3,16	147.4 - 170.5	Katzman (1973)
Chloor	125	9	Van Harreveld (1966)
	117,9	14.5 - 29.6	Katzman (1973)

Elektrolytwaarden van ECF en ICF bij de kat, uitgedrukt in meq/l.

## 1.4 water

### 1.4.1 inleiding

Water is één van de componenten, die onontbeerlijk zijn voor alle facetten van het leven der organismen. Water kan een fatale rol spelen in een aantal pathologische processen. Dit geldt in het bijzonder voor hersenoedeem, waar het watergehalte - lokaal of totaal - toeneemt (zie hoofdstuk 2).

Vele onderzoekers hebben zich intensief beziggehouden met het bepalen van het watergehalte in de hersenen onder normale en pathologische omstandigheden van de mens en verschillende diersoorten. Weisbach (Katzman, 1973) maakte reeds in 1868 het onderscheid tussen het watergehalte van de grijze en de witte stof bij de mens (zie tabel V). In de loop van de tijd zijn de bepalingsmethoden gemodificeerd en is de gebruikte apparatuur sterk verbeterd.

Tabel V

specie	totaal	cortex	witte stof	Referentie
mens		83 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	Weisbach <sup>d</sup>
		85.3	70.2	Thudichum <sup>d</sup>
		84.3	70.7	Stewart-Wallace (1939)
		86	70.4	DeRegibus <sup>d</sup>
kat	82.3	83.1	74.7	Agrawal (1967)
	77.3			Frei (1973)
		80.0	67.3	Hochwald (1974)
		81.0	68.9	Nakazawa (1969)
		80.7 <sup>b</sup>	68.0 <sup>b</sup>	Pappius (1963)
		81.8 <sup>b</sup>	68.0 <sup>b</sup>	Pappius (1974)
		85.0	76.3	Van der Veen (1973)
		80.6	72.4	Bakay (1964)
		80.8 <sup>c</sup>	71.4 <sup>c</sup>	Bakay (1975)
hond	80.0			Van Harreveld (1966)
		80.0	67.8	Fenske (1973)
aap	80.0 <sup>c</sup>	80.0 <sup>c</sup>	69.9 <sup>c</sup>	Herschkowitz (1968)
rat	79.08			Yamaguchi (1975)
		83.3		Van Harreveld (1966)

Watergehalte in hersenweefsel (gram/100 gram vers gewicht).

a. gemiddelde van serie leeftijdsgroepen

b. omgerekend vanuit het droog gewicht

c. 100 (vers gewicht - droog gewicht) / vers gewicht

d. naar Katzman (1973).

De bepaling van het watergehalte bleef niet beperkt tot de witte en de grijze stof. Agrawal (1967) toonde een verschil aan in het watergehalte tijdens de ontwikkeling van de kat.

Hij bepaalde het watergehalte in het totale hersenweefsel, de cortex, het cerebellum, pons-medulla, colliculi, thalamus-hypothalamus, nucleus caudatus en hippocampus-amygdala gedurende tien stadia van ontwikkeling van de kat. Vermeldenswaardig zijn de resultaten van Lorenzo (1975), waarin de waterverdeling gedurende de ontwikkeling van de kattenhersen voor de verschillende delen - met de daarbij behorende ECS - wordt vervolgd (zie tabel VI).

Tabel VI

	prenataal		postnataal			
	vroeg	laat	3 dagen	21 dagen	3 maand	1 jaar
hersen						
totaal	90.1	88.6	88.6			79.5
ECS	23.5	19.4	21.4	18.7	18.7	18.2

Percentage van het weefselwater in de ontwikkeling van de kat (Lorenzo, 1975).

Het normale watergehalte varieert met de ontwikkelingsfase van de hersenen. De relatieve dichtheid van het hersenweefsel neemt - in de tijd gezien - toe, als gevolg van de toename van de vaste stof en de afname van het watergehalte (zie tabel VI). De daling van het watergehalte is gecorreleerd aan de toename van het lipidegehalte in de hersenen. Deze toename is het gevolg van de toenemende myelinisatie en membraanvorming in bepaalde delen van de hersenen (Agrawal, 1967; Katzman, 1973).

#### 1.4.2 osmolaliteit

De osmolaliteit is een temperatuur-afhankelijke maat voor de osmotische druk waarbij de osmotische concentratie wordt weergegeven in Osmol per kilogram oplosmiddel. Het blijkt uit de waarde voor de osmolaliteit, dat er een ongehinderde uitwisseling is van water tussen het bloed en de weefsels. Dit houdt in, dat er geen actief transport van water mag bestaan (Leaf, 1970). De osmolaliteit van de hersenen is nagenoeg gelijk aan die van het bloed en de CSF (Hochwald, 1974). Zelfs gedurende chronische extracellulaire hyper- of hypo-osmolaliteit treedt er onderling nauwelijks verandering op (Arieff 1972). (N.B. CSF is een weinig hypertoonisch ten opzichte van het plasma!).

De osmolaliteit van de hersenen kan o.a. berekend worden door middel van vriespuntsdaling of kookpuntsverhoging van het weefselmonster (Hossmann, 1976). Deze methoden zijn in onbruik geraakt als gevolg van de relatief grote fout, die ontstaat door autolyse. Autolyse in weefselmonsters kan bij 0 °C binnen tien minuten de osmolaliteit doen verdubbelen. Onmiddellijk invriezen van de monsters na verwijdering uit de schedel (binnen 10 seconden), gevolgd door extractie in kokende aqua

dest, heeft het voordeel, dat lytische enzymen zodoende gedes-trueerd worden (Arieff, 1972). De osmolaliteit van normale kattehersen is  $308 \pm 3$  mOsm en van het plasma  $297 \pm 3$  mOsm (Hossman, 1976). Acute hypo- of hyperosmolaliteit veroorzaakt een significant verschil in osmolaliteit tussen bloed en hersenen; er ontstaat een osmotisch gradiënt tussen plasma, CSF en hersenweefsel. Bij experimenteel opgewekte chronische, extracellulaire hyperosmolaliteit (7 uur - 1 week) is de osmolaliteit van hersenweefsel, CSF en plasma gelijk. Wanneer de plasma-osmolaliteit wordt verstoord volgt er een snel hersel van de ontstane gradiënt tussen plasma-, CSF- en hersenweefsel-osmolaliteit, door een nettotransport van water door het capillair endotheel (Rapoport, 1976).

Behalve dit exogene water bestaat er een nettoproductie van endogene hersenwater. Dit zogenaamde metabolische water, dat vrijkomt bij het aerobe glycolysemetabolisme kan voor de kattehersen als volgt berekend worden: voor kattehersen met een gemiddeld gewicht van 30 gram en een glucoseverbruik van  $31 \mu\text{mol/gr/uur}$  (Kanig, 1973) bedraagt de waterproductie ongeveer  $100 \mu\text{l H}_2\text{O/uur}$ . Vergeleken bij de liquorproductie (zie tabel II) van  $20 \mu\text{l/min}$  is dit slechts 8% van de totale vloeistofproductie in de hersenen.

#### 1.4.3 waterbeweging

Onder normale omstandigheden bestaat er een vrije diffusie van water vanuit de hersencapillairen naar de ECF en vanuit de ECF naar de hersencellen; het omgekeerde is eveneens mogelijk. Dit is in tegenstelling tot de meeste ionen, die zich van een speciaal transportmechanisme bedienen bij de passage van celmembranen. Waterverplaatsing wordt onafhankelijk beschouwd van de elektrische weerstanden der membranen. Hoe het moleculair mechanisme voor waterverplaatsing door lipide membranen functioneert is nog niet geheel duidelijk. De zgn. poriëntheorie (kanalen, waardoor het water en niet-elektrolyten de membranen kunnen passeren) wordt algemeen geaccepteerd (Rapoport, 1976a). Toch bestaat er enige kritiek op deze theorie voor de waterpassage van membranen (Katzman, 1973; Crone, 1975).

Paulson (1977) toont aan dat er hoogstwaarschijnlijk geen poriën aanwezig zijn in de BBB en dat het watertransport gebeurt door het oplossen in de membraanfase. Acute serumosmolaliteitsverandering (zie 1.4.2) veroorzaakt een waterverplaatsing totdat een nieuw osmotisch evenwicht is bereikt (vgl. 1.8).

Klinisch kan de ICP verlaagd worden door intraveneuze toediening van dehydrerende agens. Dit zijn hyperosmolaire oplossingen zoals ureum, mannitol, glycerol (Beks, 1967; Beks, 1974; Reinglass, 1974; Guisado, 1976).

De diffusiepermeabiliteit voor water van het bloed naar de hersenen is bij een verhoogde cerebrale bloeddorstrooming (CBF) "diffusion-limited". Dat wil zeggen, dat het water in plasma niet volledig equilibreert met het water in het hersen-

weefsel. Dit hebben onderzoeken van Bolwig (1975) aangetoond in rattehersenen. Ook Bolwig meent (vgl. Paulson, 1977) dat water niet zo vrij als een lipofiel gas de BBB kan passeren. Raichle (1974) vindt bij de rhesusaap, dat gelabeld plasma-water niet vrijelijk equilibreert met het uitwisselbare hersenwater, indien de CBF groter wordt dan 20 ml/min/100 gr. Bij een CBF van 50 en 140 ml/min/100 gr equilibreert maar 90% respectievelijk 60% van het geïnjecteerde gelabelde water. De resultaten van Raichle (1974) geven te denken bij de interpretaties van BBB-transportonderzoeken, waar gelabeld water als standaard wordt gebruikt.

Met behulp van de gepulste kernspinresonantie techniek (pulsed Nuclear Magnetic Resonance = NMR) kan zonder destructieve handelingen te verrichten intracellulair en extracellulair water van elkaar onderscheiden worden. Op plaatsen in de hersenen met vochtophoping zullen waterprotonen zich in een omgeving bevinden, die men als een "vloeistofmilieu" kan omschrijven; op andere plaatsen in het weefsel bevinden waterprotonen zich in de directe nabijheid van macromoleculen (zgn. "vaste stofmilieu") (Bakay, 1975). Hersenoedeem verlengt de relaxatiesnelheid van het weefselwater (d.w.z. in de richting van de lange relaxatietijden van vrij water), omdat bij hersenoedeem relatief meer water is dan in normaal hersenweefsel, waardoor het relaxatietijd verkortende effect van de weefselmacromoleculen als het ware verkleind wordt (Go, 1975).

#### 1.4.4 verandering in de waterhuishouding

In het kort zullen enkele pathologische veranderingen worden genoemd, waarbij de indeling van de verschillende typen oedeem (zie 2.1) als leidraad zal dienen.

##### *a. BBB beschadiging*

Bij de BBB beschadiging treedt een zgn. vasogeen oedeem op (zie 2.2). Hierbij zal een exsudaat zich in het gebied van de (aangebrachte) laesie verspreiden onder invloed van haemodynamische factoren. Het exsudaat zal zich voornamelijk in de ECS van de witte stof ophopen. De waterverplaatsing is een secundair effect; het water volgt passief de exsuderende ionen en eiwitten.

Deze vloeistof, die afkomstig is uit het bloedplasma, stroomt door de ECS en wordt gedreven door de bloeddruk. Volgens Reulen (1973 en 1977) ontstaat een extracellulair drukgradiënt van weefselwater op de weg van de uitbreiding van het oedeemvocht.

##### *b. verandering energiemetabolisme*

Bij het cytotoxisch hersenoedeem is de pathogenese vergelijkbaar met die van de asfyxie, hypoxie en ischaemie, namelijk een verstoord energiemetabolisme. Bij asfyxie en hypoxie

treedt een waterverplaatsing op van de ECF naar de ICF (zie 1.8). Bij de celzwellling stroomt kalium uit de cel en natrium en chloor de cel binnen. Alleen een volledige ischaemie induceert veranderingen in de water- en elektrolytverdeling van de ECF en ICF.

Volgens Pappius (1975) mag men bij ischaemie niet spreken van een zwelling, omdat dit inhoudt dat wij dan nog te doen zouden hebben met levend weefsel. Dit is namelijk onjuist; door een complete ischaemie treedt irreversibele beschadiging en necrose op. Bij onder andere TET-intoxicatie hoopt vloeistof zich op in blaasjes tussen de lamellen van de myelineschede (zie 2.4).

### *c. osmotische geïnduceerde veranderingen*

Wanneer er zich een osmotisch gradiënt tussen bloed en hersenweefsel bevindt, dan ontstaat er een nettoverplaatsing van elektrolyten en water in één richting door de BBB om het osmotisch evenwicht te herstellen. Deze waterverplaatsing is merkbaar aan een verandering in weefselvolume, indien  $\Delta \pi$  ongeveer 35 mOsm bedraagt.

## 1.5 barrières in de hersenen

Het begrip van bloed-hersen barrière is - historisch gezien - ontstaan in het begin van deze eeuw na de ontdekking van Goldman (1913), dat bepaalde in het bloed opgeloste stoffen, die zeer snel in de meeste delen van het lichaam terecht komen, niet doordringen tot of equilibreren met het hersenweefsel en de CSF. Goldmans zg. "eerste experiment" hield in, dat het centraal zenuwstelsel niet gekleurd werd na intraveneuze toediening van trypaanblauw. Een dergelijk experiment werd reeds in 1885 uitgevoerd door Ehrlich m.b.v. aniline (Siegel, 1972). Bij het zgn. "tweede experiment" vertoonde het hersenweefsel een diffuse kleuring wanneer de kleurstof direct in de CSF werd ingespoten. Soortgelijke proeven zijn daarna vele malen herhaald met de meest uiteenlopende stoffen, intracerebraal of in de CSF ingebracht, zoals ouabaine en peroxidase (Cornog, 1967; Brightman, 1970).

Goldman schreef het verschijnsel primair toe aan de eigenschappen van het zenuwweefsel, dat de kleurstof niet wilde opnemen. Anderen zochten de verklaring in de eigenschappen van de stof, zoals de moleculaire grootte, de lading, de lipidoplosbaarheid enz. Pas later heeft men begrepen, dat de eigenschappen van het hersenweefsel de verklaring voor het fenomeen bloed-hersen barrière moesten geven; de eigenschappen van de cerebrale capillairen, de gliamembraanvoetjes om de capillairen, de specifieke permeabiliteit, de afwezigheid van bindweefsel etc.

Daar niet één van de genoemde eigenschappen alléén verantwoordelijk is voor het verschijnsel moeten alle factoren,

die mogelijke selectieve permeabiliteitseigenschappen vertonen bij de evaluatie van het barrièreprobleem betrokken worden. Uitgaande van deze gedachte en het gegeven van het drie-compartimenten-systeem (zie 1.1) moet het begrip barrière onderverdeeld worden in drie typen barrières, die zich tussen de compartimenten bevinden:

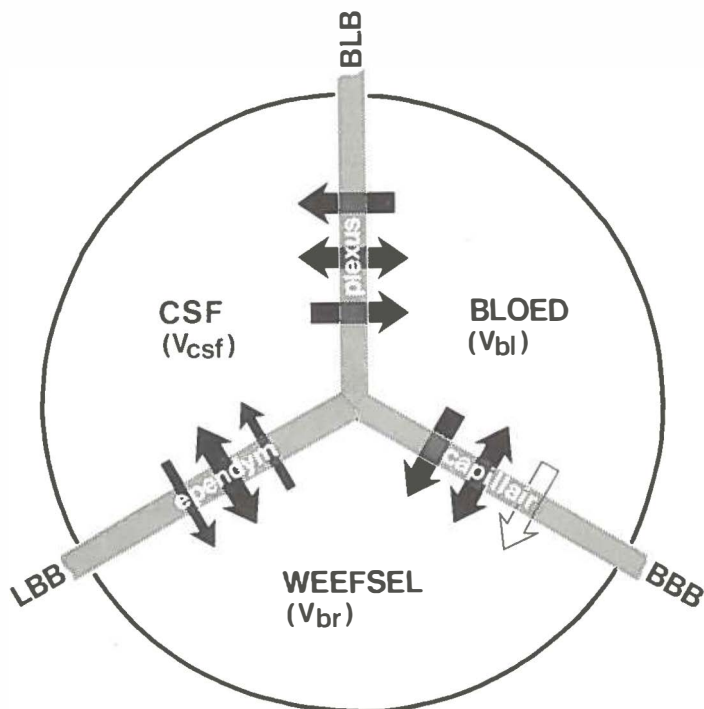


Fig. 2. Schematische voorstelling van de barrières in de hersenen.

- passieve diffusie    BBB = bloed-hersens barrière
- pinocytose            BLB = bloed-liquor barrière
- actief transport    LBB = liquor-hersens barrière

De intercellulaire verbindingen - algemeen aangeduid met "cell junctions" - bepalen voor een groot deel de fysiologie van de permeabiliteit van de vaten en in het bijzonder de samenstelling van de CSF en ECF. De belangrijkste junction is de "tight junction", omdat het in staat is een concentratiegradiënt voor grote moleculen tussen vloeistofcompartimenten in stand te houden. De tight junctions worden o.a. aangetroffen tussen de endotheelcellen van de vaten (BBB) en ook tussen de epi-theelcellen van de plexus choroïdeus (BLB). De tight junctions worden gevormd aan de apicale zijde van de cellen door de celmembranen van twee naast elkaar liggende cellen. Zij lijken op een "fusie" van de buitenste plasma-membranen, zodat ze

ontstaan door bestaande structuren (Brightman, 1970; Gardner, 1972) . De tight junctions of zonulae occludentes tussen de epitheelcellen maken een intercellulair transport onder normale omstandigheden onmogelijk. Bij een hyperosmolaliteit van het plasma kunnen epitheelcellen reversibel krimpen, waardoor de afsluitende functie van de tight junctions wegvalt en plasma-componenten de ECS binnenstromen (Rapoport, 1971 en 1973; Brightman, 1973; Rapoport, 1976a en 1976b; Sterrett, 1974; Davson, 1976). Onderstaande tabel bevat enkele gegevens van de belangrijkste junctions.

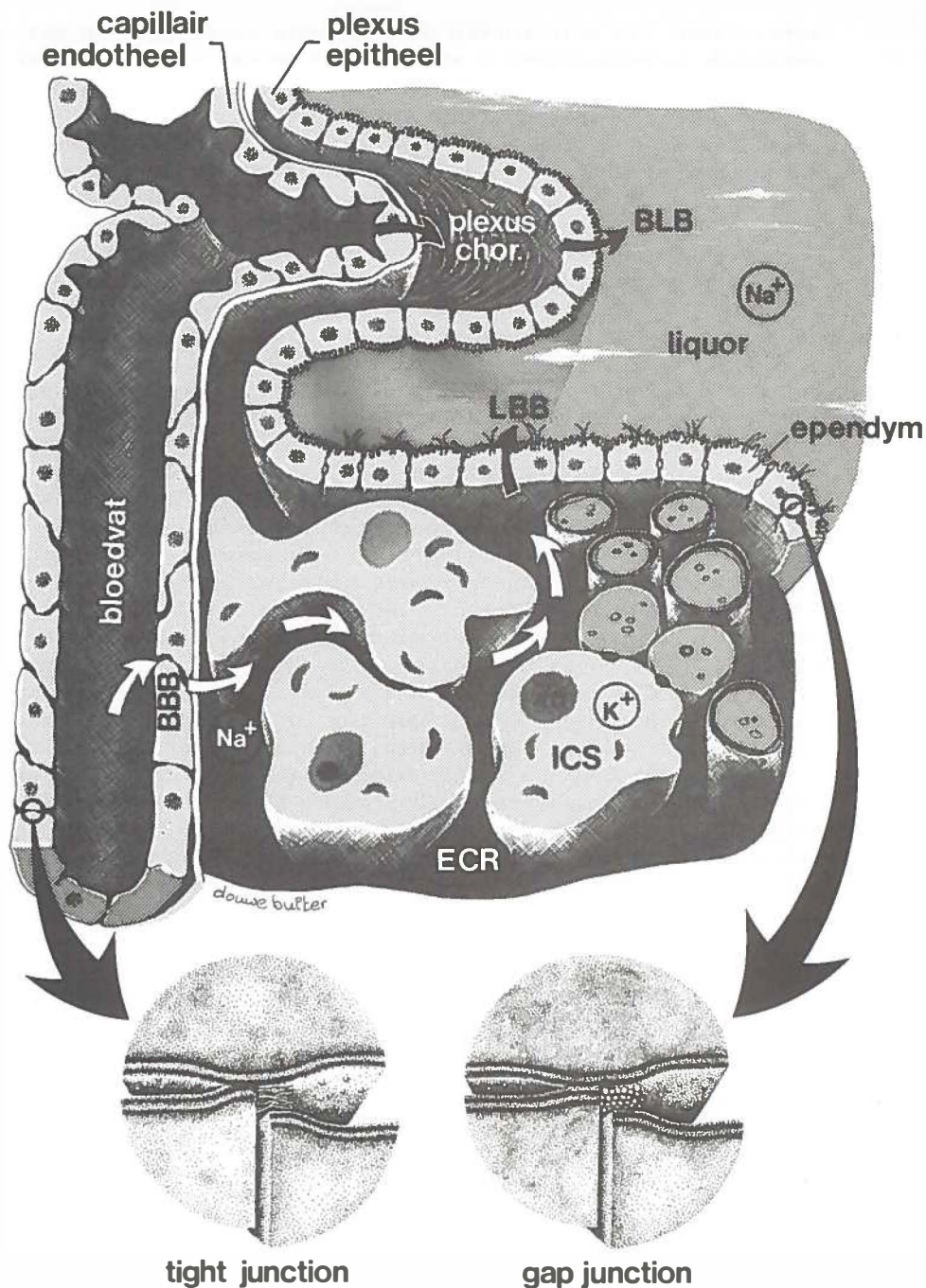
Tabel VII

type	functie	ultrastructurele eigenschappen
Desmosoom (Macula adherens)	celadhesie	1) 150 - 350 Å tussen de plasma-membranen van 2 cellen 2) ECS bevat eiwit-materiaal 3) discontinu
Gap junction (Nexus)	intercellulaire uitwisseling	1) 20 - 40 Å tussen de plasma-membranen van 2 cellen 2) hexagonale subunits 3) discontinu
tight junction (Zonula occludens)	restrictie voor inter-cellulaire diffusie	1) minder dan twee membranen dik 2) fibrillair netwerk verbindt plasma-membranen 3) rondom cel als continue ring

Nomenclatuur en eigenschappen van de drie belangrijkste junctions (naar Rapoport, 1976a).

In dit hoofdstuk wordt gesproken over het begrip "barrière". De engelstalige literatuur spreekt over een "Blood-Brain Barrier" (hier BBB), een "Blood-CSF barrier" (hier BLB), maar hoofdzakelijk over een "CSF-Brain-Interface" (hier LBB). De in dit proefschrift gebezigde uitdrukking LBB is, gerelateerd aan de BBB en de BLB, niet een volwaardige barrière in die zin, dat door de LBB weinig stoffen worden verhinderd van het ene compartiment (ECF) naar het andere compartiment (CSF) actief dan wel passief te worden getransporteerd. Het bezit ook niet de tight junctions (zie fig.3), zoals wij die vinden bij de BBB en de BLB. Toch kan men het ependym en de pia mater als een soort barrière opvatten, omdat er een ouabaine-gevoelig carrier trans-





Figuur 3. Schematische voorstelling van de vorming van ECF en CSF. De junctions in het capillair endotheel en ependym zijn vergroot weergegeven (vergelijk tabel 6)

portsysteem zou zijn tussen de cerebrale ventrikels en het aangrenzende hersenweefsel - althans bij de kat - voor glucose en een hieraan verbonden actief transportsysteem voor ionen zoals Na, Cl en K (Brøndsted, 1969a, 1969b).

Veelal wordt de uitdrukking BBB gebezigd voor de afscheiding tussen de hersenen in zijn totaliteit en de rest van het lichaam. De LBB is dan een barrière tussen hersencompartimenten onderling. Om verwarringen te voorkomen zal in de volgende hoofdstukken de barrière, waarvan op dat moment sprake is, bij name worden genoemd.

#### 1. 5. 1 bloed-liquor barrière (BLB)

Het bloed en de CSF zijn in de plexus choroideus van elkaar gescheiden door capillaire endotheel en plexus epitheel. De in het interstitium van de plexus gestroomde vloeistof - afkomstig van het bloed - ondervindt een selectieve barrière bij de passage van het epitheel, nadat het de endotheelcellen van de plexus capillairen (d.m.v. fenestraties) is gepasseerd.

Van een passieve uitwisseling is weinig sprake; er zijn actieve transportmechanismen en carriermechanismen aanwezig. (Wright, 1972; Johanson, 1974; Wright, 1974; Siegel, 1976).

Het gevolg van de specifieke secretie-eigenschappen van de plexus is, dat bepaalde stoffen (o.a. kalium, glucose, creatinine) in de CSF een lagere concentratie bezitten dan kan worden toegeschreven aan een diffusieproces. Omgekeerd kunnen andere stoffen (zoals magnesium en chloor) in de CSF een hogere concentratie bereiken dan in het bloed (zie tabel III). Het aanwezige actieve transportmechanisme werkt hoogstwaarschijnlijk volgens eenzelfde carriersysteem als het renale tubulaire transport voor organische zuren (Fishman, 1975). Een actief transportmechanisme kan verzadigbaar zijn. Wanneer bijvoorbeeld de concentratie van jodium of thiocynaat in het bloed zal stijgen boven een kritisch niveau, dan zal de concentratie voor beide stoffen in de CSF eveneens stijgen (Katzman, 1973; Davson, 1976). Het transportsysteem is niet in staat de gradiënt tussen de CSF en het plasma (jodiumconcentratie is in de CSF lager dan in plasma) in stand te houden.

#### 1. 5. 2 bloed-hersen barrière (BBB)

Evenals in het voorgaande type bestaat er een barrière, die gelegen moet zijn rondom de capillairen. Morfologisch gezien zijn de capillairen in het hersenweefsel volledig omringd door een basaalmembraan. Er bestaan geen fenestrae of poriën in het endotheel, zoals in de plexus. Ook bij dit barrièretype bevinden zich tussen de endotheelcellen tight junctions - in tegenstelling tot de hart- en skeletspier -, die de passage van eiwitmoleculen vanuit het lumen naar de extravasculaire ruimte tegengaan. Intraveneus ingespoten mieriksperoxidase HRP\* (M = 42.000) en zelfs microperoxidase (M =

\* HRP = horse-radish peroxidase

1800) zijn niet in staat vanuit het capillaire lumen naar de perivasculaire ruimte en de ECS te diffunderen via de intercellulaire ruimte en de tight junctions (zie fig. 3). Uitlopers van de gliacellen - astrocyten-eindvoetjes genaamd - bedekken + 85% van het capillaire oppervlak. In de hersenen zijn gebieden, die niet het barrière-fenomeen vertonen. Deze delen worden wel intens blauw gekleurd na intraveneuze toediening van trypaanblauw of Evans blue. Morfologische verschillen zijn er met de rest van het hersenweefsel door de aanwezigheid van fenestrae in het endotheel van de capillairen. Tot deze gebieden behoren: hypophyse, tuber cinereum, area postrema, de plexus choroideus, parafyse, glandula pinealis, crista supraoptica en corpus subfornicalis (Brightman et al. 1970; Go, 1970). De endotheelcellen en de astrocyten-eindvoetjes kunnen als een anatomisch substraat van de BBB worden beschouwd (Go, 1970). Mitochondria maken voor 8 - 11% deel uit van het endotheliaal cytoplasmatisch volume in de capillairen van weefsel met een BBB. Weefsel zonder BBB-eigenschappen hebben een mitochondriaal volume van 2 tot 5% van hun cytoplasmatisch volume (Oldendorf, 1977). Volgens Oldendorf zou er een relatie bestaan tussen de hoeveelheid mitochondria en het in stand houden van een iongradiënt tussen bloedplasma en de ECF, de extrachoroidale CSF-aanmaak of om de structurele eigenschappen van de capillairen in het centraal zenuwstelsel in stand te houden. De positie van de gliacellen tussen de capillairen en de neuronen doet vermoeden, dat de gliacellen een belangrijke schakel vormen in het transport van voedingsstoffen vanuit de bloedbaan naar de hersencellen. Ondanks aanwijzingen in die richting is het nog niet gelukt een transport van dien aard in de astrocyten aan te tonen. Vise (1975) vindt met elektronenmicroscopie met behulp van "Selective Neuronal Stainings" (SNS), dat de gebruikte kleurstof alleen in de neuronen terecht komt en niet in de ECS. Hieruit concludeert hij, dat het (kleurstof)transport via de astrocyten-eindvoetjes dóór de astrocyten naar de neuronen plaatsvindt. De astrocyten zouden niet alleen over een bijzonder transportsysteem beschikken, eveneens moet men ze zien als een functioneel apart compartiment, volgens Vise (1975). Een methode voor het meten van de capillaire permeabiliteit is de indicator-diffusietechniek, ook wel aangeduid als "single injection"-techniek. Bij deze techniek worden twee stoffen simultaan ingespoten, waarbij één van de stoffen - de referentie - niet uit de capillairen kan treden (Bolwig, 1975).

Uit het voorgaande blijkt, dat de permeabiliteit van het bloedvatstelsel in de hersenen sterk verschilt met die van de rest van het lichaam. De diffusie is voor de meeste stoffen nihil of beperkt met uitzondering van lipoidoplosbare stoffen en water (zie 1.4). Zo is de halfwaardetijd in de hersenen van apen voor de capillaire uitwisseling  $t_{\frac{1}{2}} = 2 - 4$  min, gemeten met  $D_2O$  en  $t_{\frac{1}{2}} > 240$  min voor sucrose (Fenstermacher, 1974).

### 1.5.3 liquor-hersen barrière (LBB)

De scheiding van de CSF en hersenweefsel wordt verzorgd door het ependym en de pia. Er is relatief weinig bekend over deze barrière wat betreft de uitwisseling van stoffen. Aangenomen wordt dat de samenstelling van de ECF niet of weinig verschilt met die van het CSF (zie 1.3.1 en 1.3.2). De diffusie van eiwitten en andere hydrofiele moleculen in beide richtingen is vnl. te danken aan de afwezigheid van de tight junctions tussen het ependym en de piacellen. Injecteren van verschillende stoffen vertoont zowel diffusie, pinocytose als actief transport tussen de ventrikels en het aangrenzend hersenweefsel. HRP - intraventriculair ingespoten - diffundeert tussen de ependymcellen naar de ECS, maar passeert de LBB ook d.m.v. pinocytose (Brightman et al., 1970). Voor glucose, natrium en kalium is een ouabaine-sensitief transportmechanisme gevonden. Niet alle glucose wordt actief getransporteerd; na uitschakeling van dit mechanisme blijkt 40% van de fluxus van glucose te berusten op een diffusieproces. Het actief transportproces voor glucose is Na-K-afhankelijk. Het natrium wordt naar de CSF en het kalium naar de ECF getransporteerd (Brøndsted, 1970a; Brøndsted, 1970b; Cserr, 1971). Serumalbumine, sucrose en ureum - intraventriculair ingespoten - worden vnl. door diffusie van de CSF naar de ECF verplaatst (Fenstermacher, 1974). De ventrikelvloeistof heeft niet alleen een mechanisch beschermde functie als vloeistofkussen maar ook een chemische spoelfunctie nl. de aanvoer van voedingsstoffen en de afvoer van metabolieten. Tevens is er een bufferfunctie, nl. de opname van stoffen uit de ECF, die in te hoge concentratie kan voorkomen. De constante aanmaak van de CSF in de plexus en de afvoer via de villi arachnoidales naar het veneuze bloed zorgt voor een constante verdunning van de stoffen, die in de CSF diffunderen uit het hersenweefsel en/of het bloed. Davson (1967) spreekt terecht over de "sink action" van de liquor. Met andere woorden, de CSS fungeert als de riolering van de hersenen. Wanneer de "lozing" van stoffen vanuit de ECF naar de CSF langzamer geschiedt dan de afvoer via de villi, dan zal er een concentratiegradiënt van die stoffen ontstaan. Hiervoor is wel een snelle passage door de LBB een vereiste (zie fig. 2). Dit verklaart de lage <sup>131</sup>I-concentratie in hersenweefsel en de CSF en haar hoge concentratie in plasma (Davson, 1973; Davson, 1976; Siegel, 1976). Voor de verzadiging van jodium- en thio-cyanaattransportmechanisme zij verwezen naar 1.5.1. In ons onderzoek is de afvoer van plasma- en cytoplasmatische eiwitten uit de ECF via de sink action van belang (vgl. het onderzoek van Maas, 1977).

### 1.5.4 veranderingen van de barrièrepermeabiliteit

De BBB en de BLB hebben een beschermende functie; zij zorgen er voor, dat fluctuaties van plasmacomponenten niet merkbaar zijn in de hersenen. Door de delicate functie van de hersenen

is de samenstelling van de CSF en de ECF én de concentratieveranderingen, waarbinnen fluctuaties mogen optreden aan nauwe grenzen gebonden.

De CSF en ECF verschillen van plasma of van plasma-ultrafiltraat. Deze verschillen worden in stand gehouden door de BBB en BLB. Pas bij een veranderde barrièrepermeabiliteit - reversibel dan wel irreversibel - treden stoffen uit de bloedbaan in de CSF of het hersenweefsel.

Verzadiging of een competitieve inhibitie van een actief transport heeft een schijnbare permeabiliteitsverandering tot gevolg. Patlak en Fenstermacher (1975) geven een uitstekend literatuuroverzicht, aangevuld met een eigen theoretische benadering over de al dan niet meetbare en beïnvloedbare parameters van de barrièrepermeabiliteitsveranderingen.

Factoren, die een effect hebben op deze permeabiliteit zijn (zie hoofdstuk 2):

- traumata (Klatzo, 1962; Go, 1967; Ishii, 1967; Giacomelli, 1970; Ikaluza, 1971; Häggendal, 1972; Hermann, 1972; Westergaard, 1976)
- toxische stoffen (Olsson, 1970; Baethmann, 1973 en 1975; Laursen, 1975).
- hyperosmolariteit (Rapoport, 1971 en 1973; Brightman, 1973; Sterrett, 1974; Rapoport, 1976).

Voor ons onderzoek is het trauma van belang. Iedere beschadiging aan het vasculair systeem in de hersenen resulteert in een verandere permeabiliteit van de BBB. In tegenstelling tot de chemische inductie van hersenoedeem hebben wij hier te doen met een aselectieve permeabiliteitsverhoging. De verandering in de aangetaste vaten (focaal of totaal) is in de eerste plaats een destructie van het endotheel in het gelaedeerde gebied en het verdwijnen van de barrière-eigenschappen. Eveneens is een verhoogde endotheliale pinocytose zichtbaar rondom de aangebrachte laesie (Hirano, 1969).

Als indicator voor de BBB-permeabiliteitsverhoging is gebruik gemaakt van de volgende mogelijkheden:

- <sup>125</sup>I gelabeld eiwit (Cutler, 1964; Hermann, 1972)
- fluoresceïne gelabeld dextran (Olsson, 1975) of serumeiwitten (Klatzo, 1962),
- plasmacomponenten die normaliter niet in de hersenen voorkomen, zoals FFA (Pazzagli, 1970) en  $\alpha_2$ M-globulinen (Schliep, 1974)
- lichaamsvreemde eiwitten en stoffen, zoals HRP (Brightman, 1970; Westergaard, 1976), neoprontosil (Faber, 1974) en ferritine (Raimondi, 1962)
- plasma-eiwitgebonden kleurstoffen, zoals trypaanblauw en Evans blue (Clasen, 1962; Bakay, 1964; Fenske, 1973).



## 1.6 elektrolyten

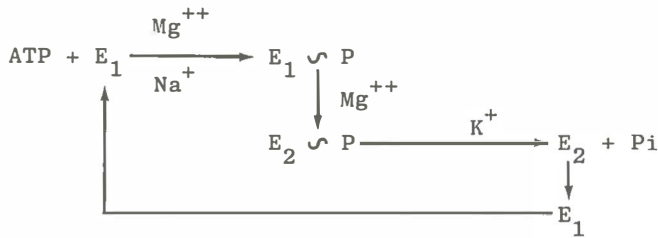
### 1.6.1 inleiding

De elektrolytsamenstelling van de hersenen en het constant houden van deze concentraties in de CSF en ECF is van wezenlijk belang voor het optimaal functioneren van de hersenen. Dit geldt in het bijzonder voor natrium en kalium in verband met hun functie bij de vorming van actiepotentialen. Tabel III laat zien, dat de elektrolytsamenstelling van de CSF en plasma niet aan elkaar gelijk zijn; dit verschil wordt in stand gehouden door een actief transportmechanisme in de plexus choroideus (Johanson, 1974; Husted, 1976, bepaald bij de kat). De regulering van de CSF-elektrolyten wordt in de regel bestudeerd met behulp van ventriculocisternale perfusie. Hiermede kan niet alleen het effect van de variërende plasma- en CSF-elektrolytenconcentratie bestudeerd worden maar ook de plaats van de regulatie (Vogh, 1975; Wald, 1975; Husted, 1976). Elektrolyten zijn verdeeld over de drie hersencompartimenten, te weten hersenweefsel, liquorruimte en vaatvolume. Aangenomen wordt, dat de elektrolytconcentraties van de CSF ongeveer overeenkomen met die van de ECF. De preciese localisatie in de cel is niet geheel bekend. Vast staat, dat zich in de cel geen ruimte bevindt, waarin alle intracellulaire elektrolyten zijn verzameld. Zij worden gevonden o.a. gebonden aan celorganellen. Laatstgenoemden kunnen elektrolyten zó sterk aan zich binden, dat zij moeilijk uit te wassen zijn bij een poging de quantiteit van één of alle elektrolyten te bepalen. Er is voor bepaalde elektrolyten geen sprake van een vergelijkbare concentratie tussen ECF en ICF, zoals wij die wel vinden tussen CSF en ECF (zie tabel III en IV). Bepaalde ionen worden door de ICF opgenomen en dienen als buffervoorraad. 30% van het kalium in de hersenen is gelocaliseerd in de mitochondrien (Katzman, 1973). Dit is hoger dan in de rest van het lichaam. De elektrolytenconcentratie varieert niet alleen per organisme; voor de verschillende delen van de hersenen van één organisme zijn ook verschillen aangetoond (Katzman, 1973).

### 1.6.2 iontransport en pompmechanisme

De zeer nauwe grenzen, waarbinnen de kationconcentraties zich bewegen (1.6.1) en het gegeven, dat het grootste deel van de kationen in de geïoniseerde staat verkeren, wijst erop, dat het onderhouden van een constante concentratie in de hersenen afhankelijk is van een transportmechanisme. Ondanks het feit, dat van de moleculaire vorm van het transportmechanisme voor de elektrolyten weinig bekend is moet dit specifieke mechanisme zich in de celmembranen bevinden en wel op capillair niveau. Het actief transport voor natrium en kalium, dat eveneens op cellulair membraanniveau een gradiënt in stand houdt, is magnesium-afhankelijk. Het Na-K-afhankelijke ATPase enzym heeft ATP

als energierijke verbinding nodig, waarbij het natriumtransport gekoppeld is aan een - in tegengestelde richting getransporteerde - kalium-fluxus. Het werkingsmechanisme kan als volgt worden voorgesteld:



De fosforylering geschiedt in afwezigheid van kalium. Dit ion is alleen nodig voor de hydrolyse van het intermediair. Laatstgenoemde ondergaat een allosterische transitie, waarvoor het magnesium noodzakelijk is. Bij een zeer hoge natrium- of kaliumconcentratie is enzyminhibitie mogelijk, omdat ieder ion, ondanks een eigen specifieke bindingsplaats het andere ion van zijn specifieke bindingsplaats kan verdringen (Katzman, 1973). Er is dan sprake van een competitie.

De uitwisseling van elektrolyten tussen hersenweefsel en de CSF zou geschieden door een diffusieproces. Toch meent Brøndsted (1970a, 1970b) een ouabaine-gevoelig transportmechanisme te hebben gevonden, dat bovendien glucose transporteert. Dit is in tegenspraak met de resultaten van Wald (1975) (zie 1.6.3).

### 1.6.3 natrium

Het meest voorkomende ion, zowel in de CSF als in de rest van het lichaam, is het natrium-ion, dat voor + 95% de totale kationconcentratie uitmaakt. CSF en plasma zijn nagenoeg in osmotisch evenwicht (Hochwald, 1976). Desalniettemin is de ( $\text{Na}^+$ ) plasma lager dan die van de CSF. Plasma bevat beduidend meer eiwitten van de CSF (zie tabel IX, 1.5) Plasma bevat - het watergehalte eveneens in beschouwing genomen (plasma = 93%  $\text{H}_2\text{O}$ ; CSF = 99%  $\text{H}_2\text{O}$ ) - meer natrium dan CSF, uitgedrukt in meq/kg  $\text{H}_2\text{O}$ .

Uit proeven met intraveneus ingespoten  $^{24}\text{Na}$  volgt, dat er een volledige uitwisseling tussen  $\text{Na}^+$  plasma en  $\text{Na}^+$  lichaamsweefsel plaatsvindt binnen 20 min; in de hersenen duurt een volledige uitwisseling evenwel + 12 uur (Bakay, 1965). Natrium kan via verschillende wegen de hersenen binnendringen. De permeabiliteit van de BBB voor  $^{24}\text{Na}$  is zeer laag in tegenstelling tot water (Go, 1975a). De passage van natrium in de plexus choroideus naar de CSF geschiedt veel sneller dan door de hersencapillairen.  $^{24}\text{Na}$  bereikt in de CSF na ongeveer 150 minuten eenzelfde concentratie als dat in plasma. De  $^{24}\text{Na}$  Natriumconcentratie is in de grijze stof, die grenst aan de ventrikels

en de subarachnoidale ruimte, het hoogst van het hersenweefsel. Daar natrium relatief snel diffundeert van de CSF naar het omliggende hersenweefsel ontstaat er een gradiënt van de subarachnoidale en ventriculaire oppervlakten naar de dieper gelegen weefselstructuren. Dit verklaart de grote verschillen in halfwaardetijden van  $^{24}\text{Na}$  bij de verschillende onderzoekers; deze varieert van  $t_{1/2} = 13$  min tot  $t_{1/2} = 24$  uur. Wald et al. (1975) vinden met behulp van ventriculocisternale perfusie, dat de Na-fluxus van het omliggende weefsel naar de ventrikels plaatsvindt door middel van diffusie. Uit deze proeven volgt eveneens, dat de intraveneus ingespoten  $^{22}\text{Na}$ -uitwisseling gecorreleerd is aan de CSF-aanmaaksnelheid, hetgeen wijst op een actief transportmechanisme in de plexus. Het door Wald gevonden diffusieproces is in tegenspraak met het actief transportmechanisme in de LBB, zoals Brøndsted (1970a, 1970b) dat voorstelt. Interessant zijn de proeven van Go (1975a). Hij bepaalde de relatie tussen de natriumopname van het hersenweefsel met behulp van  $^{24}\text{Na}$  en de arteriële bloeddruk bij verschillende temperaturen. Uit de resultaten blijkt, dat er naast een bloeddrukafhankelijke component voor de natriumpassage van de capillairwand, er een temperatuurafhankelijke component bestaat.

Dit zou wijzen in de richting van een actief transportmechanisme voor natrium in de BBB of niets anders dan de genoemde diffusie van natrium uit de CSF.

Tabel VIII

	totale hersenen	witte stof	grijze stof	Referentie
muis	$230.9 \pm 7.0$ $52.4 \pm 1.2^*$			Baethmann 1973
hond		$166.3 \pm 4.4$	$276.0 \pm 7.8$	Fenske 1973
mens		158	193	Stewart-Wallace 1939
kat	$250.1 \pm 9.4$			Frei 1973
		$71 \pm 5^*$	$68 \pm 8^*$	Nakazawa 1969
		$49.1 \pm 2.8^*$	$58.0 \pm 3.6^*$	Ganser 1974
		$59 \pm 3^*$	$68 \pm 7^*$	Pappius 1963
		$58 \pm 6^*$	$53.9 \pm 3.7^*$	Katzman 1973

Natriumconcentratie in hersenweefsel (meq/kg nat gewicht),  
\* uitgedrukt in meq/kg droog gewicht

#### 1.6.4 kalium

Het langzaam equilibreren van  $^{42}\text{K}$  tussen plasma en hersenweefsel is identiek aan dat van  $^{24}\text{Na}$  (zie 1.6.3). Ook kaliumionen worden sterk gehinderd vanuit de capillairen door de BBB in het weefsel te stromen. Het kaliumtransport is gekoppeld aan dat van het natrium (1.6.2).  $\text{K}^+$  - geïnjecteerd in de CSF - vertoont een opname door het omliggende hersenweefsel, die na-



genoeg even snel is als de opname van kaliumionen door andere lichaamsweefsels uit de bloedbaan (Katzman, 1973; Husted, 1976). Hetzelfde verschijnsel is zichtbaar bij  $^{24}\text{Na}$ . Ook de  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  wordt binnen zeer nauwe grenzen gehouden (Johanson, 1974). Kunstmatig verhoogde of verlaagde  $(\text{K}^+)_{\text{plasma}}$  heeft nauwelijks een verandering in de  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  tot gevolg (Husted, 1976). Hyperkaliaemie bij katten met een  $(\text{K}^+)_{\text{plasma}} \geq 6 \text{ meq/l}$  geeft een lichte stijging te zien in de  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  van  $\pm 2.5\%$ . Het actief transportmechanisme is verzadigbaar. Met desoxycortison kan de  $(\text{K}^+)_{\text{plasma}}$  met 50% verlaagd worden; het effect op de  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  is dan 5% (Husted, 1976). Zelfs chronische  $(\text{K}^+)_{\text{plasma}}$  veranderingen tasten de  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  nauwelijks aan. Zo constant de  $(\text{K}^+)_{\text{plasma}}$  kan worden gehouden, zo snel is de verandering na de dood. De post mortem-waarden voor  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  zijn dan zeer snel gelijk aan de  $(\text{K}^+)_{\text{plasma}}$  (Katzman, 1973). Uit perfusieproeven heeft men de conclusie getrokken, dat de  $(\text{K}^+)_{\text{ecf}} = (\text{K}^+)_{\text{csf}}$  (zie 1.3.2), ondanks het feit dat uitwisselingsmechanismen in de pia- en ependymoppervlakken voor kleine verschillen kunnen zorgen.

Wanneer er vanuit wordt gegaan, dat transfercoëfficiënten gelijk zijn - d.w.z.  $k_{\text{csf} \rightarrow \text{ecf}} = k_{\text{ecf} \rightarrow \text{csf}}$  - dan geldt dat  $(\text{K}^+)_{\text{csf}} = (\text{K}^+)_{\text{ecf}}$ . Directe metingen, uitgevoerd in de cortex met behulp van ionselectieve elektroden bij ratten door Vyskocyl (1972), laten zien, dat de  $(\text{K}^+)_{\text{ecf}} = 2.98 \text{ meq/l}$ . Dit komt overeen met de  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$ . Hansen (1977) meet in de ratteccortex met behulp van ionselectieve elektroden  $(\text{K}^+)_{\text{ecf}} = 3.0 \pm 0.5 \text{ mM}$ . Blank (1977) meet in de kateccortex (1 mm diepte) op eenzelfde wijze  $(\text{K}^+) = 3.4 \pm 0.19 \text{ mM}$ . Gedurende hypoxie ( $\text{pO}_2$  daalt tot 20 - 23 mmHg) zal dan de  $(\text{K}^+)_{\text{ecf}}$  lineair stijgen. Metingen met ionselectieve elektroden is door vele onderzoekers uitgevoerd en bevestigd - althans voor de cortex - dat  $(\text{K}^+)_{\text{ecf}}$  nagenoeg gelijk is aan  $(\text{K}^+)_{\text{csf}}$  (Prince, 1973; Kirschner, 1975).

Tabel IX

specie	totale hersenen	witte stof	Grijze stof	Referentie
muis	$437.5 \pm 17.3$ $99.3 \pm 3.8^*$			Baethmann 1973
hond		$267.7 \pm 7.6$	$537.3 \pm 10.3$	Fenske 1973
mens		232	228	Stewart-Wallace 1939
kat	$425.0 \pm 6.3$			Frei 1973
		$77 \pm 4^*$	$93 \pm 5^*$	Nakazawa 1969
		$93.8 \pm 4^*$	$107.7 \pm 4.5^*$	Ganser 1974
		$81 \pm 3^*$	$96 \pm 7^*$	Pappius 1963
		$82 \pm 2^*$	$87.5 \pm 6.2^*$	Katzman 1973

Kaliumconcentratie in hersenweefsel in meq/kg nat gewicht  
<sup>\*</sup> uitgedrukt in meq/kg droog gewicht.

# 1.7 eiwitten

## 1.7.1 inleiding

De concentratie van eiwitten en enzymen in de CSF en de ECF zijn van belang bij de vorming van hersenoedeem vanwege hun colloïdosmotische eigenschappen. Een eiwitbepaling in de CSF heeft pas waarde, wanneer tegelijkertijd haar concentratie in het plasma bekend is. De plasma-eiwitconcentratie kan nl. binnen een populatie, zelfs binnen één soort van uur tot uur verschillen. De totale eiwitconcentratie in de CSF is in vergelijking tot plasma bijzonder laag.

Tabel X

plasma	CSF	Ref.
7000	250	Davson 1967
6700		Zijlstra 1970
	300	Gardner 1972
7000-	200-	Bell 1959
8000	300	

Eiwitconcentraties bij de mens uitgedrukt in mg/l.

N.B. voor liquor geldt, dat de concentratie niet overal constant is; zij varieert van 15 - 59 mg%, stromend van de laterale ventrikels tot onder in de lumbale ruimte (Davson, 1967; Rasmussen, 1969).

De verschillen tussen plasma en CSF komen tot uiting bij de visuele beoordeling van beide vloeistoffen: à vue is plasma visceus en opalesk, de CSF daarentegen is waterig en helder. Vanwege de diversiteit in molecuulgewicht wordt de eiwitconcentratie meestal niet in mMol weergegeven zoals bij de elektrolyten maar in mg/100 ml.

Naar de eiwitsamenstelling in de CSF is onderzoek verricht in verband met de mogelijke diagnostische waarde, die aan de verandering van bepaalde eiwitten of enzymen ontleend kan worden. Aldus zijn specifieke eiwitpatroonsveranderingen gemeten als primair of secundair effect van een neurologisch ziektebeeld of trauma (Buckell, 1965; Hildebrand, 1973; Stiffel, 1973; Schliep, 1974; Terano, 1975; Graune, 1976; Flórez, 1976).

De BBB en de BLB staan geen eiwitpassage toe. Schliep (1974) maakt gebruik van de  $\alpha_2$ -macroglobulineconcentratie als parameter voor de conditie van de BLB, vanwege de grootte van het macroglobuline.

De LBB staat eiwitpassage wel toe, zij het, dat de diffusie langzaam geschiedt via de intercellulaire ruimte of door middel van pinocytose (Rasmussen, 1969). Eiwitresorptie uit

de CSF vindt plaats in de plexus choroideus en door de villi arachnoidalis (zie fig. 1). Met behulp van elektroforese zijn plasma- en CSF-eiwitten te scheiden in de hoofdfracties, zoals vermeld in tabel XI. Een recentelijk gevonden, snel migrerende eiwitfractie blijkt een pre-albumine te zijn. Deze fractie, die alleen in de CSF voorkomt, neemt voor  $\pm 5.6$  mg% deel in de totale eiwitconcentratie (Graune 1976). Het stijgende eiwitgehalte van de ventrikels naar de lumbale ruimte geldt niet voor het pre-albumine. De oorzaak hiervan is nog onbekend. Er is wel een netto eiwitfluxus van het hersenweefsel naar de CSF.

Tabel XI

	Alb.	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
CSF	30	16	25	14
serum	39	25	14	20
witte stof	26	31	33	10

Procentuele verdeling van eiwitten bij de kat.  
De pre-albumine fractie is - voor zover bekend - nog niet bepaald voor de kat (Rasmussen, 1969).

### 1.7.2 globulinen

Verdere fractionering van de elektroforesefracties met immunochemische methoden levert een grote hoeveelheid informatie over de globulinefractie. Niet alleen het eerder genoemde pre-albumine is CSF-specifiek. Er is een  $\gamma_c$ -globuline aanwezig met een langzamere migratiesnelheid dan de meeste  $\gamma$ -globulinen. De hersenen zijn dus in staat zelf  $\gamma$ -globulinen te synthetiseren en in de CSF uit te scheiden. Tussen het  $\beta$  en  $\gamma$  gebied zijn meerdere eiwitfracties aangetoond, die door de hersenen gemaakt moeten zijn. De concentratie van gelabeld  $\beta_1$ -globuline in de CSF bij intraveneuze toediening is na equilibratie hoger dan in het bloed. De CSF bevat eveneens een  $\beta_2$  of  $\tau$ -fractie, die niet in het bloed voorkomt. Na BBB-beschadiging daalt haar concentratie in de CSF (Davson,

Tabel XII

	Alb	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
normaal	26	31	33	10
laesie 1e dag	41	34	17	8
4e dag	27	32	29	12
14e dag	25	32	33	10

Eiwitfracties, uitgedrukt in %-totaal eiwit na toediening van een koude laesie bij katten (Rasmussen, 1969).

1967; Tirano, 1975; Graune, 1976).

Rasmussen en Klatzo (1969) geven een procentuele verdeling van albumine en globuline bij katten na toediening van een koude laesie. Uit tabel XII valt af te leiden dat er een herstelfase intreedt na enige dagen.

Klatzo (1962) had de stijging van albumine na toediening van een koude laesie reeds gevonden. Noch Klatzo of Rasmussen geven absolute waarden of relateren aan plasmawaarden. Een verhoogde  $\gamma$ -globulineconcentratie vier dagen, nadat de laesie is aangebracht, kan wijzen op een verhoging van de activiteit van het immuuniteitsmechanisme. De snelle daling van de albumineconcentratie is mogelijk te danken aan het resorptieve vermogen van de plexus voor albumine; dit geldt volgens Rasmussen (1969) echter niet voor  $\gamma$ -globuline.

### 1.7.3 eiwit in oedeemonderzoek

Plasma-eiwitten, die normaliter niet in de CSF voorkomen, kunnen bij neurologische ziektebeelden of traumata in de CSF verschijnen. Schliep (1974) vindt bij patienten met meningitis, cerebrale en spinale tumoren, metastasen en cerebrale infarcten het  $\alpha_2$ -macroglobuline, dat door een verhoogde BLB-permeabiliteit of BLB-beschadiging in de CSF terecht is gekomen.

Deze methode, om aan te tonen, dat de BLB-permeabiliteit is veranderd, is voor het omschrijven van de pathogenese a-specifiek. Een meer gericht onderzoek naar de pathogenese is de verandering van het eiwitspectrum bij de elektroforese van de CSF. Verandering van één of meerdere fracties van het eiwitspectrumpatroon is indicatief voor bepaalde pathogeneses (Graune, 1976).

Bij experimenteel onderzoek wordt vaak gebruik gemaakt van eiwitten om een verhoogde permeabiliteit van de BBB of BLB onder verschillende omstandigheden aan te tonen of als merkstof van het oedeemvocht: met jodium gelabelde serumalbumine = RISA (Lee, 1959; Cutler, 1964; Bakay, 1964), fluorsceïne gelabelde serumeiwitten (Steinwall, 1965; Klatzo, 1962) of mieriksperoxidase HRP (Olsson, 1970; Brightman, 1970; Westergaard, 1976).

### 1.7.4 enzymen

De concentratie van enzymen is over het algemeen genomen laag ten opzichte van de totale eiwitconcentratie in zowel het plasma als de CSF. Ook het centraal zenuwstelsel kan onder bepaalde omstandigheden specifieke enzymen synthetiseren. Deze enzymen zijn betrokken bij de biosynthese van neurotransmitters. De voor dit onderzoek belangrijke enzymen CPK en LDH zullen nader worden besproken.

### a. creatine-fosfokinase (CPK)

Het enzym CPK (ATP: creatine phosphotransferase; E.C. 2.7.3.2.) katalyseert de (reversibele) overdracht van de eindstandige fosfaatgroep van ATP naar creatine



Het enzym heeft een belangrijke functie bij de energievoorziening in de dwarsgestreepte spieren. Het voornamelijk cytoplasmatische CPK kan met behulp van de elektroforese worden gescheiden in drie fracties - ofwel iso-enzymen - te weten CPK<sub>1</sub>, CPK<sub>2</sub> en CPK<sub>3</sub>. De alternatieve nomenclatuur is de aanduiding resp. CPK<sub>BB</sub>, CPK<sub>MB</sub> en CPK<sub>MM</sub> genoemd naar de twee ketens, waaruit het enzym is opgebouwd. Het CPK<sub>BB</sub> migreert anodaal in de pre-albumine zone, het CPK<sub>MM</sub> migreert naar de kathode in het gebied van de gamma globuline en het CPK<sub>MB</sub> komt tussen de twee andere iso-enzymen in de α<sub>2</sub>globuline-zone terecht bij pH 8.4 (Van der Veen, 1966; Friedhoff, 1977). CPK<sub>BB</sub> komt voornamelijk voor in zenuwweefsel CPK<sub>MB</sub> in de hartspier en CPK<sub>MM</sub> in de skeletspier. In normaal serum komt alleen CPK<sub>MM</sub> voor (zie tabel XIII).

Bij hersenbeschadiging, hartinfarct of progressieve spierdystrofie kunnen de desbetreffende resp. iso-enzymen in hoge concentraties in het bloed voorkomen. De bovengrens van de normaalwaarde ligt bij de mens bij  $\pm 50$  U/l (25 °C) voor plasma en 4.8 U/l (25 °C) voor CSF (Hildebrand, 1973; Boehringer CPK test activeert., 1977). Van de kat zijn geen exacte waarden bekend; Handbook of lab, animal sci. (Melby, 1974) geeft één waarde, nl.  $19.5 \pm 6.7$  U/l voor plasma.

Tabel XIII

	BB	MB	MM
serum	0	0	0
hart	0 (0)	40 (22)	60 (78)
skeletspier	0 (0)	0 (0)	100 (100)
long	90 (64 - 84)	0 (0 - 1)	10 (16 - 35)
hersenen	90 (100)	0 (0)	10 (0)

Verdeling van de CPK-iso-enzymen in het menselijk weefsel, uitgedrukt in %.(Galen 1975; waarden tussen haakjes zijn afkomstig van Tsung, 1976).

### b. lactaatdehydrogenase (LDH)

Het enzym LDH (L - lactaat; NAD: oxidoreductase, E.C. 1.1.1.27) katalyseert de reductie van pyruvaat ten koste van twee elektronen die worden overgedragen op NADH:



De LDH-reactie vormt een belangrijke schakel in de glycolytische reactieketen en komt dus in iedere cel voor. De hoogste LDH-concentraties vindt men in het hart, de lever en de skeletmusculatuur. Van het LDH zijn vijf iso-enzymen bekend die elektroforetisch te scheiden zijn. Het LDH is een polypeptide die is samengesteld uit twee types subeenheden, te weten:  $H_4$ ,  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $MM_3$  en  $M_4$ . Meestal worden zij aangeduid als resp.  $LDH_1$  t/m  $LDH_5$ . De grootste loopsnelheid heeft het  $LDH_1$  (naar de anode) en de langzaamste heeft het  $LDH_5$ , dat in de  $\gamma$ -globulinezone terechtkomt.  $LDH_1$  en  $LDH_2$  zijn thermostaibel, in tegenstelling tot  $LDH_4$  en  $LDH_5$  die na verwarming tot  $65^\circ C$  geen activiteit meer vertonen (Zondag, 1964). De relatieve verdeling verschilt voor ieder weefseltype. Zo worden  $LDH_1$  en  $LDH_2$  in verhouding tot de overige LDH-iso-enzymen in hoge concentraties gevonden in het hart, de hersenen, nieren en erythrocyten;  $LDH_5$  komt in hoge concentraties voor in de lever en  $LDH_3$  in de milt, pancreas en bijnier. De hersenen hebben een specifiek LDH-patroon (zie tabel XIV en XV).

Tabel XIV

LDH	1	2	3	4	5
serum	25	35	20	10	10
hersenen	25	35	30	10	0

Verdeling van LDH-iso-enzym in menselijk weefsel uitgedrukt in % (Galen, 1975)

Tabel XV

LDH	1	2	3	4	5	Referentie
hersenen	52	27.2	11.8	6.9	2.0	Lindblom 1967
	50	30	10	3	7	Maas 1977
CSF	60	15	12	8	5	Maas 1977
spier	0	0	5.5	7.3	87.2	Lindblom 1967
	5	5	5	5	80	Maas 1977
serum	5	1	4	20	70	Maas 1977

LDH-iso-enzymverdeling in de hersenen en skeletspier van de kat uitgedrukt in %. De percentages van Maas 1977 zijn schattingen van een zymogram.

Verhoging van de enzymatische activiteit kan het gevolg zijn van de vernietiging van weefsel (Buckell, 1970). In de hersenen is deze verhoging zichtbaar bij traumata, cerebrovasculaire, degeneratieve of demyeliniserende pathologie (Nelson, 1975; McCormick, 1976). Bij tumoren kunnen de iso-enzymen geheel of gedeeltelijk ontstaan uit het neoplasma (Kinumaki, 1976). Verhoging van LDH in de CSF kan soms het gevolg zijn van leucocyten (Hildebrand, 1973). Dit houdt een

verhoging in van LDH<sub>4</sub> en het verschijnen van LDH<sub>5</sub> bij bacteriële en virale meningitis (Nelson, 1975).

### 1.7.5 enzymen in oedeemonderzoek

Bij het onderzoek naar enzymen in normale en oedemateuze hersenen heeft men lange tijd gebruik gemaakt van histologische technieken (Rubinstein, 1962). Deze methoden geven echter veel problemen bij de interpretatie. Rasmussen et al. (1969) vinden voor de ademhalingsenzymen een totaal verhoogde formazankleuring in oedemateus hersenweefsel, hetgeen wijst op een verhoogde enzymactiviteit. Zij vinden eveneens een stijging in de LDH-activiteit in de CSF 4 - 5 dagen na toediening van de koude laesie bij katten, terwijl het LDH-plasma constant blijft. Voor GOT wordt geen enkele verandering gevonden. De vraag blijft onbeantwoord, wanneer de stijging van de LDH-activiteit in en om het gebied van de laesie begint en hoe de enzymactiviteit zich in de tijd en de ruimte uitbreidt. Door o.a. verdunning en resorptie in het weefsel en de eigenschappen van LBB zal de LDH-activiteit tussen de laesie en de CSF sterk afnemen. (Patberg 1975 en 1977) vindt binnen een uur na toediening van een cerebrale koude laesie bij de kat een verhoogde LDH-activiteit in het omliggende hersenweefsel. Door een BBB-beschadiging zou LDH<sub>5</sub> in de hersenen terecht moeten komen (zie tabel XIV). Rasmussen meet echter geen LDH<sub>5</sub>-activiteit in de CSF waarschijnlijk als gevolg van een te lage activiteit, zoals hierboven reeds werd verondersteld. Naast het onderzoek van Rasmussen is er weinig experimenteel werk verricht op het gebied van enzymactiviteiten in hersenweefsel, serum en CSF. Vermeldenswaard is het onderzoek van Bingham (1969), die zes enzymen (drie lysomale en drie niet-lysomale) in hersenweefsel bij de rat heeft bepaald na toediening van een koude laesie, en het onderzoek van Herschkowitz (1965), waarin de verandering van de LDH- en CPK-activiteit in serum en CSF en hersenweefsel wordt beschreven na het opwekken van een osmotisch hersenoedeem bij de aap. Een verhoging in de totale LDH en/of een veranderd patroon in de LDH-iso-enzymverdeling is bij de neurologische pathologie en traumata aangetoond in het serum (Kaltiala, 1968; Rabow, 1975; Flórez, 1976; Kinumaki, 1976; Rabow, 1977), in de CSF (Kaltiala, 1968; Stiffel, 1973; Hildebrand, 1973; Nelson, 1975; Flórez, 1976), in biopsieën (McCormick, 1976; Rabow 1977a en 1977b) en in cystevocht (Buckell, 1965 en 1970). Van grote betekenis is de laatste jaren het onderzoek van het CPK.

Somer (1975) heeft CPK in plasma bepaald na hersenbeschadiging bij de mens en het konijn. Met behulp van de fluorescentietechniek kan de CPK<sub>BB</sub> na elektroforetische scheiding 3 uur na de beschadiging van hersenweefsel bij de mens in het perifere bloed worden aangetoond. Bij het konijn kon alleen een stijging in de CPK<sub>BB</sub>-activiteit in bloedmonsters, genomen uit de cerebrale sinus, worden aangetoond. Het maximum lag 6 uur na

toediening van de koude laesie. De uitwisseling van het hersen-specifieke CPK<sub>BB</sub> naar de bloedbaan is op een eenvoudige wijze aangetoond.

Een verandering in de totale CPK en/of CPK iso-enzymverdeling is aangetoond bij traumata of pathologieën in de CSF (Bayer, 1976; Wilson, 1977), in het bloed (Itano, 1975; Somer, 1975; Nealon, 1975), in serum bij kanker (Lederer, 1976), bij acute subarachnoidale bloedingen in de CSF (Kaste, 1977) en in biopsieën (Lum, 1975; Tsung, 1976).

Liquorenzymbepaling zijn in het algemeen uitgevoerd bij patienten om bij significant optredende concentratieverschillen bij te dragen tot het stellen van een juiste diagnose (Hildebrand, 1973; Terano, 1975; Graune, 1976). Volgens Stiffel (1973) zijn GAPDH-, LDH- en cholinesterase-activiteiten sterk veranderd in de CSF bij ruimte-innemende processen. Merkwaardig is, dat deze enzymen niet verder onderzocht zijn onder experimentele omstandigheden, met uitzondering van cholinesterase in het onderzoek van Maas (1977).

## 1.8 osmose

Wanneer een oplossing van een stof of een mengsel van stoffen in contact wordt gebracht met het zuivere oplosmiddel, dan zal een langzame vermenging optreden. Dit zgn. diffusieproces is te verklaren als een vergroting van de entropie.

Wordt echter tussen genoemde oplossing en het oplosmiddel een permeabele wand geplaatst, dan zal een membraanconstante moeten worden ingevoerd. Grote veranderingen treden op, wanneer het membraan semipermeabel is. Er treedt niet alleen een partiële deeltjesverplaatsing op, omdat de diffusiesnelheid voor bepaalde deeltjes nul is, maar eveneens een vloeistofverplaatsing, een elektrisch potentiaalgradiënt over het membraan en een mogelijk drukverschil over het membraan. Laatstgenoemde wordt aangeduid met de term "osmotische druk". De osmotische druk van de oplossing heeft dezelfde waarde als de druk, die de opgeloste stof zou uitoefenen als zij als een gas in het volume van de oplossing bij dezelfde temperatuur aanwezig zou zijn. Er bestaat een directe relatie tussen de osmotische druk en de opgeloste stof. Voor een enkel oplosmiddel  $s$  is de osmotische druk  $\Pi$  voor een niet elektrolytoplossing

$$\Pi = R.T.m_s$$

$m_s$  = osmolaliteit van de oplossing

$R$  = gasconstante

$T$  = absolute temperatuur

Het rechter lid van de formule moet worden vermenigvuldigd



met een osmotische correctiecoëfficiënt in geval van een niet-ideale of geconcentreerde oplossing. Deze coëfficiënt kan worden berekend uit de vriespuntsverlaging.

De concentratie van osmotisch werkzame deeltjes wordt uitgedrukt in Osmol per liter. Een temperatuur onafhankelijke maat voor de osmotische druk is de osmotische concentratie per kilogram oplosmiddel : osmolaliteit.

Voor verdunde oplossingen is het verschil tussen osmolariteit en osmolaliteit zeer gering; in het geval van plasma is het echter niet te verwaarlozen. Bij niet-elektrolyten is de osmolariteit gelijk aan de osmolaliteit; bij gedissocieerde stoffen moet de molariteit met het aantal ionen waarin het deeltje uiteen valt, worden vermenigvuldigd. Voor niet ideale oplossingen wordt een correctie ingevoerd: de activiteitscoëfficiënt  $a$  ( $a \leq 1$ ).

Indien twee, door een semipermeabel membraan gescheiden waterige fasen met elkaar in contact zijn, waarbij één der fasen ionen bevat, die zich niet naar de andere fase kunnen verplaatsen, dan ontstaat een evenwichtstoestand die wordt aangeduid als het "Donnan-evenwicht" (zie fig. 4).

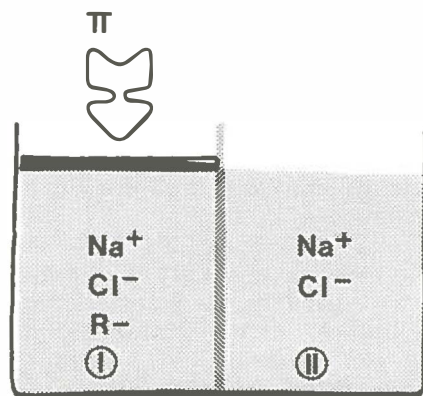


Fig. 4. Schematische voorstelling van het ontstaan van osmotische druk ( $\Pi$ ). De semipermeabele wand tussen de fasen I en II is ondoorlaatbaar voor  $R^-$ .

Doordat het eiwit  $R^-$  (als poly-elektrolyt in de oplossing) zich niet door het membraan verplaatsen kan naar fase II ten gevolge van zijn volume zal het water in fase II de neiging hebben fase I te verdunnen. Tussen I en II zal een potentiaalverschil optreden als aan een aantal thermodynamische voorwaarden is voldaan.

Onder fysiologische omstandigheden zijn de meeste eiwitten anionen. Voor de elektroneutraliteit geldt dan, dat er evenveel kationen aan die kant van het membraan komen waar de eiwitten zich bevinden. Zo kunnen de eiwitten gelijknamige ionen naar de andere kant van het membraan "drukken" (bijv.  $Cl^-$ ) en kationen aanzuigen (bijv.  $Na^+$ ). De netto-lading van de

eiwitten is uiteraard pH-afhankelijk.

De netto diffusibele ionen zijn aan de kant van de eiwitten hoger dan aan de andere kant van het membraan.

De uitwisseling tussen de intra- en extravasculaire ruimte geschiedt voornamelijk door de capillaire membranen. Het waterevenwicht tussen beide ruimten wordt bepaald door de voornoemde fysisch-chemische eigenschappen. De vochtuitwisseling tussen de capillairen en de perivasculaire ruimte is samengevat in de formule van Starling-Landis (Zijlstra, 1970), en wordt tegenwoordig als volgt weergegeven (Rapoport, 1976; naar Kedem en Katchalsky)

$$J_v = L_p \left[ P_{\text{plasma}} - P_{\text{weefsel}} - \sigma (\pi_p - \pi_w) \right]$$

$J_v$	= volume uitgewisselde vloeistof
$L_p$	= hydraulische conductiviteit
$P_{\text{plasma}}$	= capillaire hydrostatische druk
$P_{\text{weefsel}}$	= interstitiële hydrostatische druk
$\pi_p$	= osmotische druk van plasma
$\pi_w$	= osmotische druk van interstitiële vloeistof
$\sigma$	= reflectie coëfficiënt; in dit geval $\sigma = 1$ daar capillairwanden vrijwel impermeabel zijn voor eiwitten

De vloeistofuitwisseling wordt bepaald door

- de hydrostatische, en
- de colloid-osmotische druk in de capillairen en de aangrenzende interstitiële vloeistof.

a. Guyton (1971) vond een negatieve interstitiële vloeistof-druk van -7 mmHg in chronisch geïmplanteerde capsules in het subcutane weefsel van de hond. Adachi (1974a) meet met dezelfde techniek een positieve druk van +4 mmHg in het hersenparenchym van de hond. Met behulp van de "wickmethode" komen Scholander (1968) en Snashall (1971) tot minder negatieve drukken in verschillende weefseltypen dan Guyton.

b. De effectieve colloid-osmotische druk van plasma is ongeveer 25 mmHg (Tobian, 1960) en is opgebouwd uit de COP<sub>plasma</sub> (17 mmHg) en de osmotische druk, ontstaan door de hogere concentratie diffusibele ionen in het plasma (8 mmHg) (Zijlstra, 1970). Interstitiële vloeistofmonsters kunnen met behulp van de wickmethode worden geïsoleerd (Johnson, 1974), waarna de COP kan worden gemeten (Aukland, 1973). De COP van de interstitiële vloeistof, subcutaan geïsoleerd bij ratten, is gemiddeld 10 mmHg (Johnson, 1974).

Micro-osmometers, subcutaan chronisch geïmplantéerd bij konijnen, geven een gemiddelde van 10.2 mmHg (Stromberg, 1976). Door het uitvallen van de membraanfunctie zal het evenwicht tussen de intravasculaire ruimte en de perivasculaire ruimte worden verstoord. Het binnenstromen van plasma-eiwitten in

de ECS doet de COP aldaar sterk stijgen. Onder normale omstandigheden bedraagt de  $COP_{ecf}$  in de hersenen  $0.57 \pm 0.16$  mmHg (Go, 1976). De verstoring in de normale drukverhoudingen doet het watergehalte in weefsel stijgen (Go, 1970; Aukland, 1973; Fadnes, 1976)

- stuwingsoedeem ( $P_{plasma} \uparrow$ ),
- hypoalbuminemisch oedeem ( $\Pi_{eff} \downarrow$ ),
- ontstekingsoedeem ( $\Pi_{eff} \downarrow$ ),
- obstructie lymphecirculatie ( $\Pi_{eff} \downarrow$ ),
- hoog lichaamsvochtgehalte.

N.B.  $\Pi_{eff} = COP_{plasma} - COP_{interstitiële\ vloeistof}$ .

De in het begin van 1.8 behandelde theorie is ook van toepassing voor cellen, in ons geval hersencellen. Zij bevatten een hoog eiwitgehalte en worden omgeven door een ECF met een relatief zeer laag eiwitgehalte. Dat de cellen niet zwellen of barsten door de hoge osmotische druk is te danken aan het actief pompmechanisme, dat de neiging tot zwellen tegengaat (Leaf, 1970).

Handhaving van de celtoestand is afhankelijk van het weefselmetabolisme - de aerobe glycolyse verzorgt de energievoorziening voor het in stand houden van o.a. het normale celvolume - en kan voorkomen worden door een hyperosmolaliteit

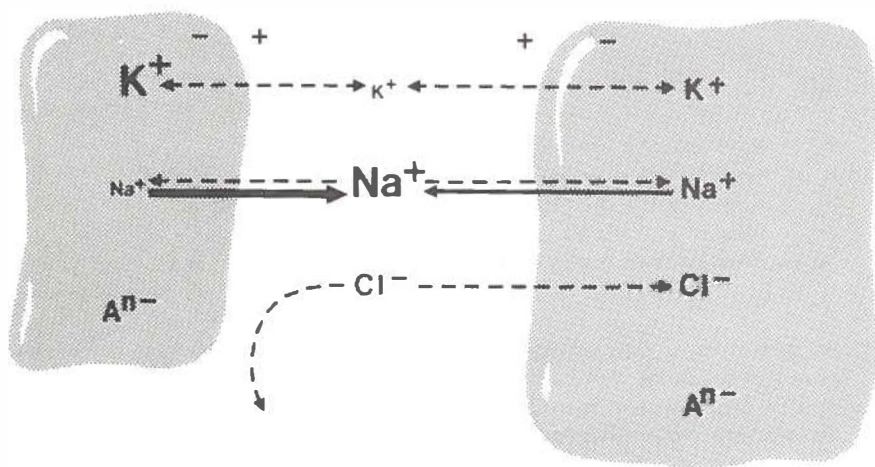


Fig. 5. Schematische weergave van een cel met een normaal metabolisme (links) en een gezwollen cel, als gevolg van een verslechterd energie-metabolisme (rechts) (naar Leaf, 1970).

van de ECF. De cel met een normaal metabolisme zorgt met zijn Na-K-pomp (zie 1.6.2.) voor een hoge ( $K^+$ )<sub>icf</sub> en een lage ( $Na^+$ )<sub>icf</sub> (zie 1.3.3). Indien het celmetabolisme wordt verstoord kan de cel niet voldoende energie verkrijgen voor het pompmechanisme om het elektrolytgradiënt in stand te houden. Het gevolg is het uit de cel stromen van kaliumionen en het de cel binnenstromen van natriumionen. Water volgt passief en de cel zal gaan zwellen (figuur 5). Dit proces is van belang bij een slechte CBF, hypoxie of anoxie en derhalve bij een slechte zuurstofvoorziening in het hersenweefsel.

## 1.9 elektrische impedantie

De ECS kan o.a. bepaald worden met behulp van de specifieke impedantie (zie 1.2.3). Deze methode is gebaseerd op de deelname van extracellulaire elektrolyten in het elektronentransport van een laagfrequente wisselstroom. De intracellulaire elektrolyten worden van dit proces buitengesloten ten gevolge van de hoge weerstand van de celmembranen.

### 1.9.1 inleiding

Het weefsel kan beschouwd worden als een suspensie van cellen in een elektrische stroom geleidend medium. De theoretische achtergrond voor de toepassing van de impedantie in hersenonderzoek ligt in de berekening van Maxwell. Hij bepaalde de elektrische weerstand van gesuspenderde bolvormige lichamen. Uitgaande van de Maxwell-formules kan de formule worden opgesteld voor een deeltje waar omheen zich een membraan bevindt. Deze formule heeft dus betrekking op cellen (Van Harreveld, 1966).

$$R_1 = R_2 + \frac{R_3}{\emptyset}$$

$R_1$  = specifieke weerstand deeltje

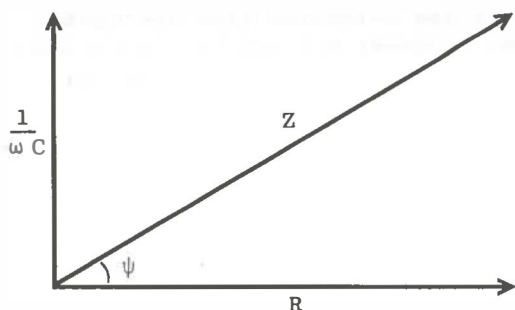
$R_2$  = specifieke weerstand in het deeltje

$R_3$  = specifieke weerstand membraan om deeltje

$\emptyset$  = doorsnede deeltje

De dimensie van specifieke weerstand is  $\Omega \cdot \text{cm}$ .

De grootte, de inhoud en het membraan van de cel, evenals hun specifieke weerstanden bepalen de impedantie. De specifieke impedantie kan beschouwd worden als een maat voor de relatieve volumeverdeling tussen de ECS en ICS. De totale weerstand - samengesteld uit de zuiver Ohmse weerstand en de capaciteit, verkregen met behulp van een wisselspanning - heet de impedantie (Z), waarvan de grootte wordt weergegeven door de lengte en de richting van de vector.



Vectordiagram

$Z$  = impedantie

$R$  = reële weerstand

$\psi$  = fasehoek

$\frac{1}{\omega C}$  = reactantie van de  
condensator  $X_C$

$C$  = capaciteit

Hiervoor geldt:  $\vec{Z} = \vec{R} + \frac{1}{j\omega C}$

Complexe schrijfwijze ( $j = \sqrt{-1}$ ), levert voor de "complexe impedantie"  $\vec{Z} = \vec{R} + jX_C$ . De inductieve component  $\omega L$  komt niet in de formule voor, omdat deze component niet aangetoond kan worden (Ranck, 1963a). Fasehoek  $\psi$  is van belang voor het berekenen van de reële weerstand  $R$ . Indien  $\psi$  nadert tot  $90^\circ$  en een hoge capaciteit aanwezig is, dan zal de impedantie  $Z$  eveneens groot zijn. De reële weerstand  $R$  nadert dan tot nul. In werkelijkheid zal de fasehoek bij metingen in hersenweefsel laag zijn (zie onder). De frequentie van de wisselstroom is bepalend voor de specifieke impedantie.

### 1.9.2 impedantie in oedeemonderzoek

In hersencortex is bij 500 cycles/sec de weefselweerstand 256 Ohm.cm; bij 10 - 20 cycles/sec loopt hij op tot 356 Ohm.cm. Een maximale faseverschuiving van  $7^\circ$  treedt op tussen 50 - 100 cycles/sec. Deze experimenten zijn bij konijnen verricht (Ranck, 1963a). Bij te lage frequenties bestaat de mogelijkheid tot polarisatie om de elektroden door een verandering in de ionconcentratie in het omringende weefsel. Baethmann (1973) vindt bij 1000 cycles/sec een zo'n kleine faseverschuiving - gemeten met behulp van een audio-oscillator -, dat deze fasehoek verwaarloosbaar klein zou zijn. Boven de 5000 cycles/sec kan dit effect totaal buiten beschouwing worden gelaten. (Van Harreveld, 1966). Fujita (1972) veronderstelt dat de polarisatie pas verdwijnt boven 1 Mc, doch geeft hiervoor geen bewijs. Van Harreveld (1966) toont aan, dat de impedantie van de witte stof 4 - 5 maal hoger is dan van de cortex.

Ranck en BeMent (1963) vinden in de witte stof van het ruggemerg bij de kat een verschil in impedantie, afhankelijk van de meetinrichting: in transversale richting 800 - 1200 Ohm.cm, in longitudinale richting 90 - 200 Ohm.cm. Een verschil in impedantie wat betreft de meetrichting in anisotrope structuren is eveneens aangetoond door Nicholson (1965). Bij asfyxie is een stijging van de impedantie in de cortex binnen 3 minuten meetbaar. Dat dit het gevolg is van zuurstofgebrek blijkt, wanneer de zuurstof in het bloed vervangen wordt door stikstof bij een normale bloeddorstrooming van de hersenen;

het impedantie-effect blijft dan hetzelfde (Van Harreveld, 1966). Een vasogeen oedeem, opgewekt met behulp van een koude laesie laat een daling van de impedantie zien (Veen, 1973). Een stijging van de impedantie is gevonden na toediening van 6-amino-nicotinamide (een metabole remmer, zie 2.3) of glutaaldehydeperfusie (Baethmann, 1973). Vergroting van de ECS bij een vasogeen oedeem of verkleining van de ECS ten gevolge van celzwellen (metabole remmer) is de oorzaak van de resp. daling of stijging van de impedantie.

De impedantie is temperatuurafhankelijk ( $2.7\%/^{\circ}\text{C}$  bij  $37^{\circ}\text{C}$  in kattehersen gemeten; Fujita, 1972), afhankelijk van de neuronale activiteit (verandering van de membraanactiviteit) en afhankelijk van de capillaire dichtheid (vasculair bed in de cortex geleidt 10% van de doorgevoerde stroom; Ranck, 1963a).

De conductiviteit in hersenweefsel is recht evenredig met de grootte van de extracellulaire ruimte. Een stijging van de impedantie is derhalve afhankelijk van verkleining van de ECS (Van der Veen, 1973).

De BBB gaat een snelle uitwisseling van elektrolyten tegen. Verondersteld mag worden dat de elektrolyten naar de ICS gaan. Als gevolg hiervan zal water passief volgen, zodat cellen zwellen en de ECS - gemeten in de cortex - zal dalen (Baethmann 1973). Glucose-infusie bij apen en konijnen laat zien, dat de impedantie in de witte stof niet verandert; in de grijze stof is een lichte stijging te constateren (Herschkowitz, 1965). Waterinfusie geeft een directe impedantieverandering zowel in de witte als de grijze stof als gevolg van een acute osmolaliteitsverandering van het plasma (zie osmose; Herschkowitz, 1965). Bij vasogeen hersenoedeem blijkt een significante negatieve correlatie te bestaan tussen de impedantie en het weefsel-watergehalte: er is een daling meetbaar in de witte en de grijze stof (Van der Veen, 1973). Bij patiënten bleek na verwijdering van een tumor de impedantie in de aangrenzende oedemateuze witte stof lager te zijn dan normaal. De aangrenzende grijze stof vertoonde geen oedeem en geen impedantieverandering (Go, 1972). In dit kader meent Go (1972) dat bij het opsporen van tumoren de impedantiedaling niet specifiek is voor tumorweefsel, maar alleen wordt veroorzaakt door oedeem in de tumor.

Fujita (1972) vindt bij katten na een met koude laesie opgewekt hersenoedeem een daling in de impedantie in de witte stof met 25%. De impedantieverandering was goed gecorreleerd aan de toename van de ECS, gemeten met behulp van sulfaat (zie 1.2.1). In tegenstelling tot Go (1972) vindt Fujita (1972) bij patiënten met hersentumoren een significante daling van 7,5 - 25% van de impedantie in de cortex. Het intraveneus toedienen van een drukverlagend medicament (mannitol) doet de ICP dalen en de impedantie tijdelijk stijgen bij de geopereerde patiënten (Fujita, 1972).

## 2 experimenteel hersenoedeem

### 2.1 inleiding

In de inleiding is ingegaan op de onenigheid aangaande de terminologie en op de aan te leggen criteria voor experimenteel hersenoedeem. Voorts zijn enkele parameters genoemd, die kenmerkend zijn voor het - voor ons van belang zijnde - vasogeen hersenoedeem. De Monroe-Kellie doctrine en de formule van Ryder (1.1) hebben de importantie van het constante intracranieële volume en in het bijzonder de samenhang tussen de volumina van de drie hoofdcompartimenten onderstreept. Indien de drempel van de compensatoire volumeverandering ( $V_{ic} \uparrow$ ) wordt overschreden treedt een intracranieële drukverhoging op ( $ICP \uparrow$ ), die het gevolg kan zijn van:

- toename van de weefselmassa ten gevolge van tumorgroei ( $V_{br} \uparrow$ ),
- excessieve dilatatie van het cerebrale bloedvatstelsel als gevolg van metabole of respiratoire acidose ( $V_{bl} \uparrow$ ) of vasoparalyse,
- vergroting van de liquorruimte als gevolg van hydrocefalie ( $V_{csf} \uparrow$ ),
- volumevergroting als gevolg van toename van het weefselwater ( $V_1 \uparrow$ ).

Voor het bestuderen van hersenoedeem kan gebruik gemaakt worden van een klinisch-chemisch en van een pathologisch-morfologisch onderzoek van hetzij patientenmateriaal, hetzij van proefdieren. Uitgaande van de definitie voor hersenoedeem geldt als enige criterium een verhoogd gehalte van het weefselwater. De belangrijkste parameters voor het vaststellen van hersenoedeem zijn:

- Hersendrukveranderingen (Bakay, 1965; Beks, 1967a; Reulen, 1973 en 1977). Deze metingen zijn alleen onvoldoende, want het verband met hersenoedeem is indirect. Hersenoedeem kan al dan niet tot een verhoogde ICP leiden, afhankelijk van de grootte van de compensatoire ruimte.
- Daling van %-droog gewicht (Stewart-Wallace, 1939; Pappius, 1963; Go, 1970; Kaluza, 1971; Baethmann, 1973; Katzman, 1973). Dit geeft geen indicatie over de omvang van het oedemateuze weefsel, indien de meting aan de totale aangetaste hemisfeer geschiedt.
- Verandering van het soortelijk gewicht van een weefselmonster in een kolomgradiënt (mengsel van bromobenzene en gezuiverd petroleum). Met behulp van deze methode kan snel en nauwkeurig het watergehalte en zwellingspercentage van oedemateus weefsel worden bepaald (Nelson, 1971). Het voordeel van deze methode is, dat er geen waterverdamping kan optreden als ge-



volg van contact met de buitenlucht tijdens de bepalingen, zoals dat wel het geval is bij de voornoemde methode van Stewart-Wallace (1939).

- Biochemische analyse.
  - . verandering elektrolytenconcentratie in oedemateus weefsel (Stewart-Wallace, 1939; Pappius, 1963; Bakay, 1964; Herschowitz, 1965; Katzman, 1973);
  - . veranderde eiwitconcentratie in oedemateus weefsel, oedeemvloeistof of liquor (Clasen, 1967; Rasmussen, 1969);
  - . verandering in specifieke enzymactiviteit in oedemateus weefsel, oedeemvloeistof, liquor of serum (Clasen, 1967, Bingham, 1969; Rasmussen, 1969; Somer, 1975; Maas, 1977).
- Markeren van het oedemateus weefsel, met behulp van gelabeld materiaal; hiervoor wordt in de regel hersenvreemde eiwitten gebruikt, die gelabeld zijn met fluorescent of radioactief materiaal of een kleurstof. Deze methode is alleen dan functioneel als de BBB permeabel wordt voor het gelabelde eiwit (Clasen, 1962; Klatzo, 1962; Raimondi, 1962; Clasen, 1970, Pappius, 1974).
- Morfologische veranderingen. Lichtmicroscopisch en elektronen microscopische onderzoeken tonen veranderingen in structuur, celzwellen en de grootte van de ECS, die primair ten grondslag liggen aan het ontstaan van hersenoedeem (Ishii, 1962; Bakay, 1964; Lee, 1965 en 1966; Ebels, 1967; Hirano, 1969; Brightman, 1970).

Er zijn in de laatste decennia een groot aantal modellen opgesteld voor het experimenteel opwekken van hersenoedeem. Voor de gevolgen hiervan zij verwezen naar "Inleiding". De klassificatie van hersenoedeem op basis van de pathogenese, zoals voorgesteld door Klatzo (1967), is algemeen aanvaard. Naast de door hem voorgestelde typen - vasogeen en cytotoxisch - zijn in de zeventiger jaren door anderen nieuwe typen toegevoegd: osmotisch oedeem (Go, 1970), interstitieel, hydrostatisch of hydrocefalaal oedeem (Manz, 1974; Fishman, 1975), hypoxisch (cytotoxisch) oedeem en oedeem als gevolg van een zogenaamde cerebraal infarct (gemengd oedeem: eerst ontstaat er een cytotoxisch oedeem, dat gevolgd wordt door een vasogeen oedeem; Katzman, 1973; Pappius, 1974). In tabel XVI zijn de gegevens van de drie belangrijkste toegepaste typen oedeem weergegeven, te weten het vasogene, cytotoxische en osmotische oedeem. Naast het zelfstandig voorkomen van de oedeemtypen is het mogelijk, dat twee typen gelijktijdig voorkomen of uit elkaar ontstaan (zie boven). Zo ontstaat vaak na een vasogeen oedeem een cytotoxisch oedeem als gevolg van ischaemie (zie figuur 6).

## 2.2 vasogeen hersenoedeem

Vasogeen oedeem is - klinisch gezien - het meest voorkomende type als gevolg van tumoren, traumata, bloedingen en ontstekingen in de hersenen (Reulen, 1976). Dit kan de reden zijn dat het vasogene oedeem het meest toegepaste experimentele type is.



Tabel XVI

	VASOGEEN	CYTOTOXISCH	OSMOTISCH
pathogenese	vergroting BBB-permeabiliteit tg. v. beschadigd capillair endotheel	celzwellling tg. v. verstoring van celmetabolisme	vochttoename weefsel tg. v. sterk veranderde plasma-osmolaliteit
localisatie	vn. witte stof (extracellulair)	witte en grijze stof (intracellulair)	witte en grijze stof (extra- en intracellulair)
oedeemvocht			
witte stof	H <sub>2</sub> O↑ Na↑ K↓	H <sub>2</sub> O↑ Na↑ K↓	H <sub>2</sub> O↑
grijze stof	H <sub>2</sub> O↑ Na↑ K↓	H <sub>2</sub> O Na↑ K—	H <sub>2</sub> O↑
vasculaire			
permeabiliteit	toename	normaal	normaal
ultrastructuur van de			
-witte stof	zwellling astrocyten; toename van de ECS	zwellling astrocyten vochttophoping in de intramyeline vacuolen; afname ECS	zwellling astrocyten; toename van de ECS
grijze stof	zwellling astrocyten	zwellling astrocyten	zwellling astrocyten
klinisch	trauma, tumor, infarct, meningitis, encefalopathie	intoxicatie, ischaemie, hypoxie, hypercapnie	nierinsufficiëntie, posthemodialysesyndroom
experimenteel	trauma, bestraling, hypertensie, implantatie	intoxicatie, ischaemie, hypercapnie, hypoxie, portocavale shunt	waterintoxicatie, hemodialyse

Veranderingen in eigenschappen van de verschillende typen hersenoedeem. ↑ = stijging; ↓ = daling; — = geen verandering.

De belangrijkste experimentele modellen voor het opwekken van vasogeen hersenoedeem zijn:

- Thermische beschadiging (Lee, 1959; Clasen, 1962; Klatzo, 1962; Pappius, 1963; Bakay, 1964; Lee, 1966; Beks, 1967a, 1967b; Nakazawa, 1969; Go, 1970; Kaluza, 1971; Reulen, 1973). Met behulp van een cryogene koelthermode of vaste koolzuursneeuw kan gedurende een bepaalde tijd een deel van de hersenen bevroren worden. Hittecoagulatie (Lee, 1959) is een weinig toegepaste methode.
- Cerebrale steekwond (Hirano, 1969; Kaluza, 1971; Persson, 1976 1976a, 1976b, 1976c). Dit kan uitgevoerd worden door het

- aanbrengen in het hersenweefsel van 20-gauge naalden, al dan niet gevuld met HRP als marker (Kaluza en Hirano). Persson gebruikt glascapillairen of roestvrijstalen naalden met een diameter van 30 - 50  $\mu$ m met als marker i.v. ingespoten HRP of Evans blue. Kaluza maakt een incisie van 1 cm diep en een lengte van 0,5 tot 1,0 cm om vasogeen oedeem op te wekken.
- Locale compressie (Ishii, 1962; Raimondi, 1962; Cutler, 1964; Nakazawa, 1969). Het vullen van een extraduraal geplaatste ballon gedurende een bepaalde tijd heeft een focaal oedeem tot gevolg, evenals het implanteren van gedroogd psylliumzaad dat door vochtopname kan zwellen (Yanagihara, 1967).
  - Ontstekingsreactie (Gonatas, 1963; Katzman, 1973). Implantatie van prikkelende stoffen, zoals soortvreemde eiwitten (PPD-pellets) kunnen door de opgewekte ontsteking oedeem veroorzaken.
  - Hypertensie (Giacomelli, 1970; Häggendal, 1972; Johansson, 1977; Rapoport, 1976).
  - Implanteren van tumoren (Aleu, 1964).
  - Ioniserende stralen (Clemente, 1954; Miquel, 1967).
  - Loodencefalopatie (Lampert, 1967; Goldstein, 1977).
  - Vasotoxische agentia (Olsson, 1970).

Het directe gevolg van voornoemde traumata is een verandering van de vasculaire permeabiliteit in het gelaedeerde weefselgebied. Op de plaats van de toegebrachte koude laesie - de meest toegepaste methode - ontstaat een haemorrhagisch infarct. Er treedt een necrose op van weefsel en bloedvaten in het corticale gebied. Deze focale aantasting van de vasculatuur bewerkstelligt een geheel of gedeeltelijk verlies van de BBB-eigenschappen door hetzij een vernietiging van het endotheel, hetzij het openen van de tight junctions (Brightman, 1970). Persson (1976b) meent, dat eiwitexsudatie ook mogelijk kan zijn door middel van diffusie door de beschadigde endotheelcellen door middel van pinocytose of door middel van transendotheliale buisachtige structuren. De opgewekte veranderingen zijn van dien aard, dat een eiwitrijk plasmafiltstraat uit de vaten naar de ECS stroomt. Het vasogeen oedeem veroorzaakt - indien van voldoende omvang - een ICP-verhoging, maar ook een lokale weefseldrukverhoging (Reulen, 1976). De ratio  $\frac{IFP}{IVP}$  nadert de waarde 1; indien  $\frac{IFP}{IVP}$  groter wordt dan 1, dan zullen de vaten collaberen. De daling van de r-CBF resulteert in een ischaemie en een acidose (lactaatvorming door anaerobe glycolyse). Weefselacidose kan de lokale CBF-regulatie verder aantasten. In eerste instantie zal een periodieke vasodilatatie zichtbaar worden door de zgn. "plateau- of Lundberg-waves"; uiteindelijk wordt de ICP zo hoog dat dat de IFP groter is dan de IVP (zie figuur 6). Uit figuur 6 blijkt dat hersenoedeem als het ware hersenoedeem voortbrengt. Door de vicieuze cirkel kan men hersenoedeem als een "autokatalysator" beschouwen. Door de lokale drukverschillen in het weefsel kunnen verschuivingen van weefselmassa optreden. Deze verschuivingen zijn in twee richtingen mogelijk, namelijk zijdelings (hersenweefsel schuift

onder de vrije rand van de falx door naar de andere hemisfeer) en axiaal. In de laatstgenoemde richting wordt hersenweefsel via de hiatus tentorii naar de infratentoriële ruimte of via het foramen magnum naar het spinale kanaal verplaatst. Als gevolg hiervan kan de aqueductus Sylvii worden dichtgedrukt en is vloeistofcommunicatie tussen supra- en infratentoriële ruimte onmogelijk geworden. De drukgradiënt tussen de verschillende intracraniële compartimenten zal daarom toenemen. Uit experimenten met katten, na toebrengen van een koude laesie zag Beks (1973) drie vormen van ademhalingsstoornissen optreden. Bij een geleidelijke toename van een verschil tussen supra- en infratentoriële druk ontstond een ademhalingstype volgens Cheyne-Stokes, dat bij een verdere stijging van het drukverschil werd gevolgd door een centrale neurogene hyperventilatie. Bij een nog verdere stijging van het drukverschil ontstond een atactische ademhaling, die mogelijk het gevolg was van een inklemming van de hersenstam - waarin het primaire ademhalingscentrum zich bevindt - in het foramen magnum. Uiteindelijk treedt een uitval op van de vasomotoriek in het gehele lichaam.

Klatzo (1967) heeft aangetoond dat het exsudatieproces onder invloed staat van de arteriële bloeddruk. Go (1974) vond, dat de exsudatie afhankelijk is van de toestand van de vasomotore autoregulatie.

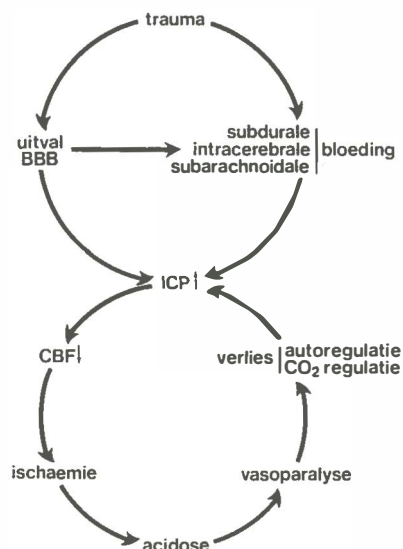


Fig. 6. Oorzaak en gevolg bij vasogeen hersenoedeem.

Tijdens een acute arteriële bloeddrukverhoging of -verlaging zal de vorming van het exsudaat verhoogd resp. verlaagd worden. De uitbreidingsnelheid van het oedeemvocht is niet alleen afhankelijk van de aard, dosis, duur en plaats van het toe-

gediende trauma, maar kan beïnvloed worden (Beks, 1974).

Dit is mogelijk door:

- vermindering van  $V_{br}$  met behulp van steroïden, hyperosmolaire oplossingen of diuretica,
- vermindering van  $V_{bl}$  door toepassing van hypothermie, hypotensie, hyperbaar zuurstof en hyperventilatie,
- Vermindering van  $V_{csf}$  door het afnemen van liquor.

Reulen meent dat de drijvende kracht van het exsudatieproces de capillaire transmurale drukgradiënt is; dit is het verschil tussen de intravasculaire en interstitiële vloeistofdruk (Reulen, 1976, 1977). Vanuit het gelaedeerde gebied breidt het oedeem zich nagenoeg bolvormig uit, met dien verstande, dat de voortplantingssnelheid van het exsudaat in de gelaedeerde cortex groter is dan in de aangrenzende witte stof (Manz, 1974). Dit verschijnsel is nog niet geheel verklaard. Het feit, dat oedeemvocht zich hoofdzakelijk in de witte stof ophoopt is duidelijk aangetoond; een verklaring voor dit verschijnsel is evenwel nog niet gegeven. Men is geneigd deze verschijnselen toe te schrijven aan het verschil in capillaire dichtheid, de metabole eigenschappen en de structurele verschillen van de grijze en de witte stof (vnl. reticulair gerangschikte cellenstructuur respectievelijk meer regelmatig parallel gerangschikte axonen; Ganser, 1974; Baethmann, 1974). De voortplantingssnelheid van moleculen met een groot onderling verschil in diffusiecoëfficiënt en molecuulgewicht (bijv.  $^{14}C$ -sucrose en gelabeld albumine) blijkt in de witte stof gelijk te zijn (Klatzo, 1967). De opgeloste stoffen van het exsudaat breiden zich verder uit dan zij zouden moeten doen op grond van - theoretisch berekende - zuivere diffusie. Reulen (1975, 1977) concludeert hieruit, dat de zogenaamde "bulk flow" het belangrijkste mechanisme is voor de uitbreiding van de totale oedeemvloeistof. Het verloop van de oedeemuitbreiding kan gevolgd worden met behulp van kleurstoffen of gelabelde stoffen. Ondanks onveranderde BBB-permeabiliteit van de niet door trauma aangetaste stof wordt dit weefsel doordrongen met de oedeemvloeistof (Steinwall, 1965).

### *morfologie*

Morfologisch gezien wordt hersenoedeem gekarakteriseerd door een toename van het totale weefselvolume t.g.v. vloeistofophoping in het hersenparenchym. Macroscopisch is dit zichtbaar door de afvlakking van de gyri, het verdwijnen of vervormen van de sulci, subarachnoidale ruimte en ventriculaire ruimte. Er kunnen verschuivingen van de hersenmassa optreden: verdringing van mediane structuren, herniatie van gyrus cinguli, uncus hippocampi of cerebellaire tonsillen (Bakay, 1965; Go, 1970). Op het snijvlak van de coupe is de scheiding tussen de witte en de grijze stof vervaagd. De aan de laesie grenzende cortex vertoont een lichte zwelling. Macroscopisch is in dit gebied een degeneratie van de astrocyten en een vergroting van de perivasculaire ruimte te zien, die gevuld is met een eosino-

fiel PAS-positief exsudaat (Kaluza, 1971). Op de elektronen-microscopische foto's lijkt de ECS hier normaal. In de witte stof daarentegen is de ECS sterk vergroot en vertoont op de foto's hetzelfde effect als materiaal dat lijkt op plasma (Klatzo, 1967).

### *chemische veranderingen*

Voor de samenstelling en de mogelijke veranderingen in de CSF, ECF en ICF zij verwezen naar hoofdstuk 1 "Algemene beschouwing" Tabel XVII geeft de verandering weer van het watergehalte, natrium en kalium bij experimenteel hersenoedeem, opgewekt met behulp van een gestandaardiseerde koude laesie bij de kat.

Tabel XVII

	aantal proefdieren	witte stof droog gewicht	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	cerebrale cortex droog gewicht	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
blanco	17	32,0 ± 1,5	56 ± 5	83 ± 4	19,3 ± 0,6	59 ± 5	102 ± 5
dagen na de laesie							
1	11	21,4 ± 2,4 <sup>●●</sup>	90 ± 8 <sup>●●</sup>	57 ± 6 <sup>●●</sup>	18,3 ± 1,0 <sup>●</sup>	74 ± 8 <sup>●</sup>	88,5 ± 7 <sup>●●</sup>
2	11	24,2 ± 2,1 <sup>●●</sup>	77 ± 7 <sup>●●</sup>	66 ± 10 <sup>●●</sup>	19,7 ± 0,9	65 ± 4	94 ± 7
3	2	22,8	83	60	19,0	70	99
5	2	28,1	70	70	19,5	80	95

Gemiddelde ± SD (indien N groter dan 6). Droog gewicht: mg/100 mg vers gewicht; natrium en kalium in mM/kg vers gewicht. Significant verschillend van de normaalwaarden:

●●p < 0,01 en ● p < 0,05.

De verandering in de witte stof komt overeen met een toename van 70% in het volume van het aangetaste weefsel, wanneer het droog gewicht van de oedeemvloeistof gelijk gesteld wordt aan dat van plasma.

De gewichtstoename bereikt 48 uur na het toedienen van een koude laesie (volgens de methode van Klatzo) een maximum. Er treedt een stijging op in het Na- en Cl-gehalte en een daling in het K-gehalte, gemeten in totaal weefsel. De veranderingen in de Na- en K-concentraties zijn vergelijkbaar met de opname van een vloeistof, die overeenstemt met de electrolytenconcentratie in plasma.

De daling van de (K<sup>+</sup>) in oedemateuze witte stof toont een verdunning aan van het weefselkalium met een vloeistof, die een lagere kaliumconcentratie bezit. Er treedt geen nettoverlies op van het kalium per kilogram droog gewicht (Pappius, 1974). Siegel (1973) heeft een stijging aangetoond van intraveneus toegediende <sup>22</sup>Na in het oedemateuze weefsel na experimentele micro-embolie bij ratten. Dit is voornamelijk intracellulair natrium als gevolg van celzwellen. Natrium van plasmatische oorsprong zorgt voor een concentratieverhoging van dit elektrolyt in het oedemateuze weefsel.

De oedeemvloeistof bevat een grote hoeveelheid eiwit in ver-

houding tot de normale ECF (Rasmussen, 1969). De oedeemvloeistof ondergaat waarschijnlijk enige verdunning en contaminatie met intracellulaire componenten gedurende de isolatieprocedure (Clasen, 1967; zie. 1.2.3). Afgezien van het onderzoek op oedeemvloeistof van de hersenen en ECF van spierweefsel van Clasen (1967) resp. Ling (1975) zijn chemische analyses alleen uitgevoerd op oedemateus weefsel en op de CSF. Voor verandering in eiwitconcentratie en enzymactiviteiten zij verwezen naar 1.7.

### *herstel en resolutie*

De vasculaire permeabiliteit in het gelaedeerde gebied neemt gedurende 24 tot 28 uur toe na het toebrengen van een koude laesie; daarna treedt een herstelfase in - afhankelijk van de ernst en omvang van de laesie - en een resolutie van het exsudaat (Herrmann, 1972; Pappius, 1974). Resolutie is dan pas mogelijk, wanneer de vasculatuur zich in de herstelfase bevindt. Hermann et al (1972) hebben de ontwikkeling en herstel van de BBB onderzocht in ratte<sup>h</sup>ersenen. Als indicator voor de BBB-functie gebruikten zij <sup>125</sup>I-dijodofluoresceïne en <sup>51</sup>Cr gelabelde erythrocyten. 21 uur na toebrengen van een koude laesie volgens de methode van Klatzo bereikt de BBB-indicator een maximum; daarna daalt de indicatorconcentratie snel naar een minimum, dat 10% van de maximale waarde is. Zij noemen dit de "herstelfase". Het watergehalte van hersenweefsel, dat grenst aan het gelaedeerde gebied bereikt een maximum 24 uur na toebrengen van de koude laesie. Er treedt binnen 12 uur een daling op tot 55% van de maximale waarde (dit is 36 uur na toebrengen van de laesie). Het tweede maximum 46 uur na de trauma voor zowel de indicatorconcentratie als het watergehalte is niet te verklaren.

Microglia, pericyten en astrocyten vertonen een actieve fagocytose van eiwitten uit het oedeemvocht. De accumulatie van fagocyten is elektronenmicroscopisch zichtbaar rondom de vaten in het gebied, direct onder het endydym en de pia mater (Baker, 1971). De activiteit van de enzymen, die betrokken zijn bij het energiemetabolisme, is sterk verhoogd in de astrocyten, ongeveer twaalf uur na toebrengen van een koude laesie (Rubenstein, 1962). Aangenomen wordt, dat de astrocyten betrokken zijn bij het verwijderen van de oedeemvloeistof. Persson past de techniek van het toebrengen van reproducteerbare steekwonden toe voor het onderzoek naar de reversibele BBB-permeabiliteitsverhoging in het hersenweefsel van de rat. Door op verschillende tijdstippen na het geven van een steekwond intraveneus peroxidase of Evans blue te injecteren, is hij in staat drie dagen na het geven van de laesie een herstel van de BBB te constateren (Persson, 1976b en 1976c). De oedeemvloeistof wordt voornamelijk geresorbeerd door de venulae in het parenchym en door de liquorruimte, van waaruit het afgevoerd wordt via de arachnoidale villi naar het veneuse bloed (Klatzo, 1967; Reulen, 1976; zie "sink action" 1.5.3).

Intraveneus ingespoten RISA en  $^{14}\text{C}$ -sucrose, die normaal niet de hersenbarrière kunnen passeren, worden bij ventriculocisternale perfusie in de liquor aangetroffen op het moment, dat het oedeemvloeistoffront de ventrikelruimte heeft bereikt (Reulen, 1976). Een andere mogelijkheid tot resorptie wordt voorgesteld door Casley-Smith (1976). Drainage van het hersenweefsel is door hen gevolgd met behulp van intracranieel ingespoten kleurstof naar de cervicale lymfeklieren via prelymfatische, niet met endotheel beklede ruimten rondom kleine en grotere vaten. Bij een door koude geïnduceerd oedeem zou de bovengenoemde prelymfatische ruimte gedilateerd zijn en gevuld met een eiwitrijke vloeistof.

## 2.3 cytotoxisch hersenoedeem

Cytotoxisch hersenoedeem onderscheidt zich van het vasogene type door een intacte BBB (zie de indicatoren, 1.5.4), celzwelling (het oedeemvocht hoopt zich op in de cellulaire elementen), een gelijkblijvende, doch meestal gereduceerde ECS en een oedeemvloeistof met een andere samenstelling (zie tabel XVI). Het oedeemvocht is vrij van plasma-eiwitten en de elektrolytsamenstelling verschilt van de normale plasmawaarden.

Cytotoxisch oedeem kan op de volgende manieren worden opgewekt:

- toediening van triethyl-tin (TET) (Reed, 1964; Lee, 1965; Bakay, 1965; Hirano, 1968; Wassenaar, 1972),
- toediening van metabole remmers, zoals
  - . 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) (Baethmann, 1975),
  - . 6-aminonicotinamide (Baethmann, 1973),
  - . ouabaine (G-strophanthine) (Cornog, 1967; Tanaka, 1967),
  - . ammonia (Kindt, 1977),
- portocavale anastomose (Laursen, 1975)
- ischaemie, anoxie, hypoxie (Klatzo, 1967; Katzman, 1974; Manz, 1974; Westergaard, 1976).

Daar de mechanismen voor het ontstaan nog niet geheel duidelijk zijn en de gevolgen van een door TET opgewekt hersenoedeem afwijkt van de andere cytotoxische noxae, wordt het TET oedeem in de literatuur meestal onderscheiden van de metabole remmers (Baethmann, 1973). Van TET wordt verondersteld, dat het de oxidatieve fosforylering remt (Baethmann, 1974). De metabole remmers zijn stoffen, die op verschillende plaatsen in de keten van het energiemetabolisme aangrijpen. 2,4-DNP remt de oxidatieve fosforylering, 6-aminonicotinamide vormt een abnormaal 6-amino-NAD(P) en remt als zodanig de NAD(P)-afhankelijke dehydrogenasen (Baethmann, 1973); ouabaine bindt zich aan en remt waarschijnlijk op deze wijze het Na-K-Afhankelijke ATPase (Cornog, 1967). Ammonia-intoxicatie leidt tot een sterke ICP-stijging. Volgens Kindt (1977) zou dit het gevolg zijn van een toegenomen intracranieel bloedvolume. Dit komt voort uit een verminderde autoregulatie, hetgeen leidt tot vasodilatatie. Of ammonia



direct toxisch werkt op het autoregulatiemechanisme van de vaatwand of aangrijpt op het metabolisch proces van het hersenweefsel is nog niet duidelijk. Bij ratten met een hepatische encefalopatie, opgewekt door middel van een portocavale anastomose, zijn de basaalmembranen, endotheelcellen en de neuropil gevuld met het i.v. toegediende HRP. De astrocyten vertonen gezwollen eindvoetjes, terwijl het cytoplasma van de cellen sporen van HRP vertoont. De membranen van deze cellen zijn mogelijk permeabel geworden of beschadigd als gevolg van deze toxisch werkende ingreep (Laursen, 1975). Ischaemie heeft dan pas effect als de (locale) cerebrale bloeddorstoming volledig onderbroken wordt gedurende een bepaalde tijd. De belangrijkste irreversibele veranderingen van het intracellulair optredende oedeem zijn de afname van het percentage droog gewicht, nettoverlies van kalium en een toename van het natriumgehalte in het corticale weefsel (Tower, 1966). Hypoxie, en in mindere mate anoxie, schijnen het watergehalte, natrium- en kaliumgehalte van het hersenweefsel niet aan te tasten (Pappius 1975), afhankelijk van de duur en de mate van hypoxie als ook de conditie, waarin het proefdier zich bevindt. Algemeen kan men stellen dat, als gevolg van de verstoring van het celmetabolisme, een energietekort ontstaat. Het ATP afhankelijk Na-K-pompmechanisme kan de iongradiënt over de celwand niet meer handhaven. Dit leidt tot het in de cel stromen van natriumionen en het naar de ECS stromen van kaliumionen. Het water in de ECF volgt het natrium passief om het osmotisch evenwicht te herstellen. De ECS, gemeten met behulp van specifieke impedantie, toont onder andere bij 6-aminonicotinamide een snelle reductie in volume als gevolg van een celzwellling (Baethmann, 1973). Elektronenmicroscopische foto's van rattehersenen na een behandeling met 6-aminonicotinamide tonen eveneens een afname van de ECS, als gevolg van gliacelzwellling. Dit is in tegenstelling tot de proeven van Aleu (1963) met TET-intoxicatie bij konijnen. Hier was geen vergroting van de ECS meetbaar op de elektronenmicroscopische foto's, ondanks de vloeistofophoping in de vacuolen tussen de lamellen van de myelineschede.

Tabel XVIII

	%-zwellling	Na	K	Cl	Albumine	Referentie
konijn, witte stof TET-intoxicatie	34	133	<sup>+</sup> 3	115	0	Aleu, 1963
hond, witte stof koude laesie	43	124	59	87	19	Clasen, 1967

Zwellingspercentage en geschatte waarden voor de oedeemvloeistof bij een cytotoxisch en vasogeen oedeem; elektrolyten uitgedrukt in mM, albumine in gr/l (Siegel, 1976)



## 2.4 osmotisch hersenoedeem

Het osmotisch hersenoedeem onderscheidt zich van het vasogene type door een ongewijzigde BBB-permeabiliteit, vochtophoping in zowel de witte als de grijze stof en een oedeemvocht, dat zeer eiwitarm is (Bakay, 1965). Voor de eigenschappen zij verwezen naar tabel XVI. Osmotisch hersenoedeem kenmerkt zich door een waterverplaatsing vanuit de capillairen naar het hersenweefsel of de liquorruimte als antwoord op een osmotisch gradiënt tussen plasma en de ECF of CSF (Go, 1975c; Hochwald, 1974). In dit geval heeft het plasma een lagere osmolaliteit dan de ECF of de CSF. Door de vochttoename in de CSS en de daaraan gecorreleerde CSFP-stijging is het mogelijk, dat er niet direct een zwelling van het omringende weefsel meetbaar is (Pappius, 1967). CSFP-metingen zijn derhalve onvoldoende voor het vaststellen van een osmotisch oedeem.

Bij de eerste onderzoeken van Weed en McKibben (1919) werden de drukveranderingen in de CSF bestudeerd na i.v. toediening van hyper- en hypotone oplossingen. Over het algemeen heeft men gebruik gemaakt van intraperitoneale (i.p.) of intraveneuze toediening van hyper- of hypotone oplossingen of water, tot 30% of meer van het lichaamsgewicht (Elliot, 1949; Luse, 1960; Herschkowitz, 1965; Wasterlain, 1968a).

Uit chemische analyses blijkt dat het vochtgehalte in zowel de witte als de grijze stof ongeveer even sterk is gestegen na een haemodialyse, die bij honden is uitgevoerd (Pappius, 1967). Het natrium- en kaliumgehalte is niet veranderd in het weefsel (mM/kg droog gewicht). Dit wijst erop dat het oedeemvocht kleine hoeveelheden elektrolyten bevat en de oedeemvorming hoofdzakelijk het resultaat is van een ophoping van water in het hersenweefsel als antwoord op de kunstmatig opgewekte osmotisch gradiënt tussen plasma en het hersenweefsel.

Morfologisch gezien is op de elektronenmicroscopische foto's een lichte vergroting van de ECS in de witte stof bij ratten meetbaar na i.p. toediening van water; de astrocyten in de witte en de grijze stof zijn licht gezwollen, terwijl de neuronen en oligodendrocyten onveranderd blijven (Wasterlain, 1968b). Volgens Pappius (1974) is het achterwege blijven van een zwelling van de neuronen mogelijk het gevolg van een specifiek mechanisme, dat preventief handelt bij volumeveranderingen. Osmotisch geïnduceerd oedeem is van voorbijgaande aard, tenzij er een beschadiging van cellulaire elementen is ontstaan. De hersenen schijnen zich snel te kunnen herstellen en naar een normale toestand terug te keren. In geval van een chronisch oedeem treedt er een netto kaliumverlies op en wordt de zwelling tot een minimum beperkt. Dit zou eveneens een beschermend mechanisme kunnen inhouden om osmotisch geïnduceerde volumeveranderingen tegen te gaan (Katzman, 1973; Pappius, 1974).

# 3 materialen en methoden

## 3.1 inleiding

In dit onderzoek zullen enkele biochemische aspecten van het experimenteel vasogeen hersenoedeem bij de kat nader worden belicht. Na de isolering van het oedeemvocht is de samenstelling van deze vloeistof bepaald onder zogenaamde "normale" omstandigheden (zie 3.2), na een inductie van een hypoxie en na intracerebraal geïnjecteerde ouabaine. Getracht zal worden een antwoord te geven op de vraag wat de bron van herkomst is en wat de optredende veranderingen in de samenstelling van het oedeemvocht in relatie tot de drie voornoemde omstandigheden zijn. Tevens zullen impedantiemetingen worden besproken. Deze metingen hebben tot doel enig inzicht te verkrijgen in de uitbreidingssnelheid van het vocht in hersenweefsel. Ook deze metingen zijn uitgevoerd onder de drie voornoemde omstandigheden.

In dit hoofdstuk zal de algemene proefopstelling worden behandeld, gevolgd door de koelmethode, de ventrikeldrukmeting, de isolatieprocedure en de daarbij behorende methoden voor het bepalen van de samenstelling van het oedeemvocht. Als laatste zal de bouw en de toepassing van de impedantietaald worden besproken.

## 3.2 proefopstelling

In alle experimenten worden de proefdieren gepremediceerd met een intramusculair toegediende injectie van luminal-natrium (50 mg/kg lichaamsgewicht in een oplossing van 110 mg/ml). Na 20 min volgt de inleidende narcose met i.p. toegediende penthotal (20 mg/kg lichaamsgewicht in een oplossing van 50 mg/ml). Wanneer de penthotal begint te werken wordt de kat op de rug op de operatietafel gelegd en vastgebonden. In de arteria- en vena femoralis van de linkerpoot worden polyethyleen canules opgeschoven tot in de aorta resp. vena cava inferior. Met behulp van deze canules kunnen stoffen aan de bloedbaan worden toegediend, bloedmonsters worden genomen en de arteriële en veneuze tensie worden gemeten (de  $P_a$  resp.  $P_v$ ). De kat wordt geintubeerd en de narcose onderhouden met een mengsel van 3 liter lachgas-zuurstof/min in de verhouding  $N_2O : O_2 = 2 : 1$  (LOOSCO dorma junior narcosecabinet). De kat blijft spontaan ademen. Alleen wanneer er zich tijdens de proef ademhalingsmoeilijkheden voordoen én bij een serie proeven met hypoxie wordt het proefdier beademd (LOOSCO infant ventilator AIV; type KR 665) met een gasmengsel als voornoemd. Het ademminuutvolume van de kat is  $\approx 0,96$  liter. Gekozen wordt voor 35 -

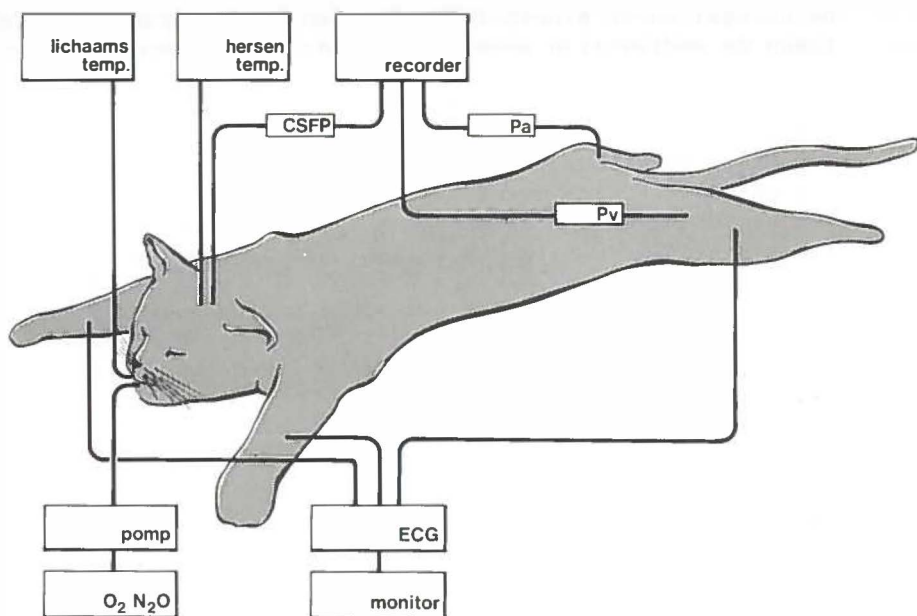


Fig. 7. Blokschema van de proefopstelling.  
Pa, Pv en CSFP zijn de Statham drukopnemers.

50 cc/slag en wel zodanig, dat  $P_{CO_2}$  tussen de 25 en 35 mmHg en de pH tussen de 7,30 en 7,40 blijft (Crosfill, 1961). Indien bij tussentijdse bepalingen van de pH en de  $pCO_2$  in het arteriële bloed te grote veranderingen optreden, dan wordt het proefdier voor korte tijd beademd. De paralyse wordt verzorgd door i.v. toegediende succinylcholine (0,05 ml/kg lichaamsgewicht). Deze dosis wordt ieder half uur herhaald om spontane ademhaling te voorkomen. Bij onrustige proefdieren wordt tijdelijk fluothaan aan het gasmengsel toegevoegd. De tensies worden gemeten met vloeistofdrukopnemers; de  $P_a$  (Statham 9103/P23AA; 0 - 75 cmHg) wordt uitgedrukt in mmHg en de  $P_v$  (Statham 18831/P23BB; 0 - 50 mmHg) wordt uitgedrukt in mmHg. De naald voor de ventrikeldrukmeting wordt eveneens op een Statham vloeistofdrukopnemer aangesloten (17257/P23BB; 0 - 50 mmHg) en registreert de druk in mmHg. De genoemde drie drukopnemers worden aangesloten op een 8-kanaals polygraaf (type R Offner Beckman-dynograph). Een kogelvormige temperatuur-opnemer is in de oesofagus geschoven voor lichaamstemperatuurmetingen (Ellab, type TE3). In een aantal experimenten is de hersentemperatuur gemeten van de gelaedeerde en de contralaterale (= controle) hemisfeer (Ellab, type DU3). Daarnaast is het elektrokardiogram gevolgd tijdens enkele proeven met behulp van een ECG-monitor (Electrodyne STAT SCOPE; ST-502) om de conditie van het hart beter te kunnen volgen. Na het draaien van het dier op de buikzijde wordt de kop in het stereotactisch toestel geplaatst (zie 3.3.2).

De schedel wordt blootgelegd door een incisie van de hoofdhuid langs de mediaanlijn gevolgd door het afschuiven van de spieren en het periost. Via het boorgat wordt de ventrikelsnaald (zie 3.3.2) in de rechter-hemisfeer gebracht op de berekende coördinaten van de laterale ventrikel. Op de recorder zijn de arteriële pulsaties en het ademhalingsritme duidelijk zichtbaar. Een buikpers of het dichtdrukken van de vena jugularis geeft een kortstondige sterk verhoogde CSFP te zien (zgn. "Queckenstedt's sign"). Dit is het bewijs, dat de punt van de naald zich in het ventrikelsysteem bevindt. Het gat voor de koelbout wordt boven de linker hemisfeer aangebracht en de bout wordt in de schedel graaid (zie 3.3.3). Hoe diep de bout moet worden ingedraaid is af te lezen van de recorder aan de CSFP-registratie.

Via een drieweg-kranensysteem in de canules kunnen arteriële bloedmonsters worden afgenomen in gehepariniseerde glazen spuit. Na het bepalen van de pH,  $PO_2$ ,  $P_{CO_2}$ ,  $HCO_3^-$ , en de saturatie (ABL-2; Radiometer) wordt het resterende bloed gecentrifugeerd (2000 g; HOMEF tafelcentrifuge) en kan indien nodig, gebruikt worden voor andere bepalingen (zie 3.3.5). In de vena femoralis wordt 5 ml van 0.5% Evans Blue oplossing gespoten voor het markeren van de laesie en om als kleurstof te dienen van de oedeemvloeistof (zie 1.5.4). Om aan te tonen, dat plasma-eiwitten bij vasogeen hersenoedeem in de oedeemvloeistof terecht komen - en dus de oedeemvloeistof voornamelijk van plasmatische oorsprong zou zijn, zijn bij proefdieren in de series I t/m IV gelabeld humaan albumine ingespoten. Daartoe wordt direct vóór de koeling en vóór plasma-afname (= blanco) ongeveer 1 mCi (milliCurie)  $^{99m}Tc$ -albumine intraveneus ingespoten. De verkregen capillairen met oedeemvloeistof en de plasmamonsters wordt eerst geteld (Academisch Ziekenhuis Groningen, Isotopenlaboratorium) alvorens over te gaan op de andere te verrichten bepalingen. Per monster wordt het aantal cpm (counts per minuut) - indien nodig - gecorrigeerd voor verval en berekend voor 1,0 cm capillair (1,0 cm capillair = 0,88  $\mu$ l).

Na het toebrengen van de koude laesie kunnen de proefnemingen worden onderverdeeld in twee groepen:

- isolering van oedeemvocht,
- impedantiemetingen.

Aan het einde van de proef wordt, indien de kat nog niet is doodgegaan aan een inklemming, occipito-cervicaal een incisie gemaakt, de membrana atlanto-occipitalis vrijgeprepareerd en een naald in de cisterna magna gebracht voor het afnemen van liquor. Het proefdier wordt opgeofferd door  $\pm$  400 mg pentothal intraveneus toe te dienen, onmiddellijk gevolgd door  $\pm$  100 ml formaldehyde voor de hersenfixatie. De kop van het proefdier wordt minimaal vier weken in de formaline-oplossing bewaard; daarna worden de hersenen uit de schedel geprepareerd. Met een microtoommes- worden met de hand in de steekrichting van de naalden (zie 3.3.4 b en fig. 16) hersencoupes gesneden van maximaal 1 mm dikte. De coupes met op het snijvlak het spoor van de naald(en) worden getekend en/of gefotografeerd om de

juiste plaats van de punt van de naalden of de ringen van de impedantienaald te kunnen localiseren. De handelingen, zoals hierboven beschreven zijn voor alle proeven en proefdieren identiek, tenzij anders wordt vermeld.

### 3.3 materialen en methoden

#### 3.3.1 proefdieren

Voor ons onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van de volwassen kat als proefdier, omdat de kat een vrij constante schedelvorm en -inhoud heeft. Dit is van belang voor het stereotactisch inbrengen van de naald voor de CSFP-metingen (zie 3.3.2), de naalden voor de oedeemvochtafname (zie 3.3.4) en de impedantie-naald (zie 3.3.6). Bovendien hebben de kattehersen voldoende witte stof om vasogeen hersenoedeem te bestuderen. Er zijn zowel mannelijke als vrouwelijke bastaardkatten gebruikt met een lichaamsgewicht, dat varieerde van 2685 gram tot 4635 gram (gemiddeld 3713 gram). De katten zijn afkomstig van het Centraal Dierenlaboratorium te Groningen.

#### 3.3.2 ventrikeldrukmeting

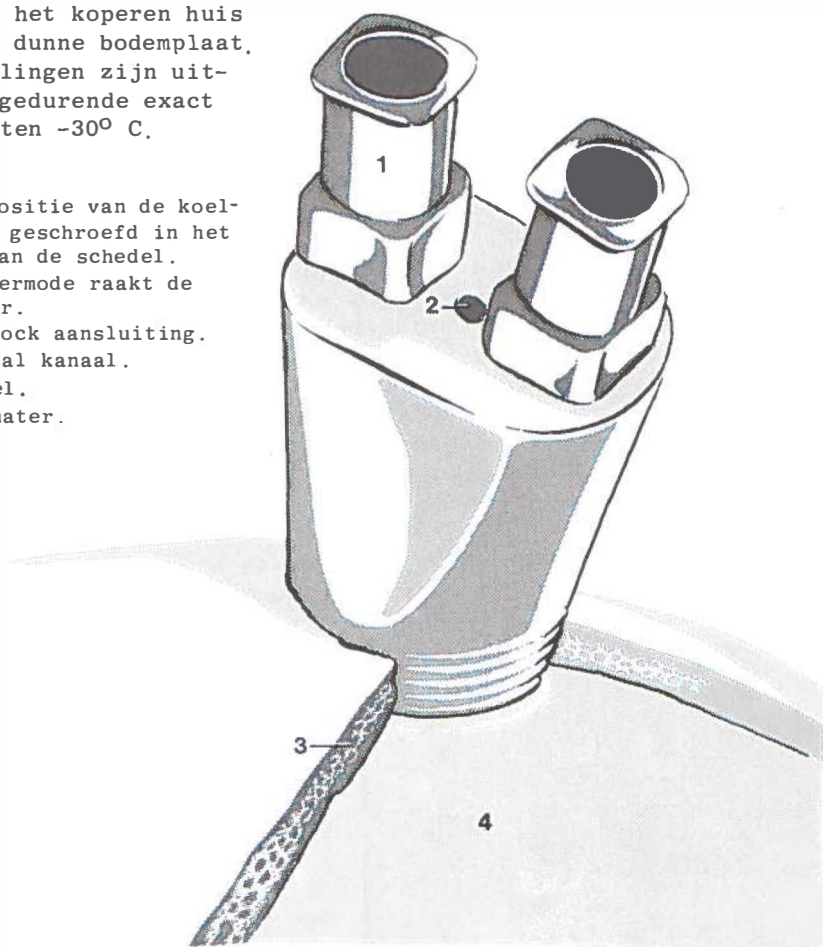
De ventrikeldrukmeting (CSFP = cerebrospinal fluid pressure) is uitgevoerd door de kat in een stereotactisch toestel te plaatsen (gebouwd door de werkplaats van het Fysiologisch Laboratorium; een verbeterd type naar het model van David Kopf Instruments, West Duitsland). De kop van de kat is gefixeerd door oorpelotten in de uitwendige gehoorgang (meatus-meatuslijn) en klauwtjes op de onderste orbitaranden (orbita-orbitalijn) (Ter Weeme, 1970). De coördinaten voor het punteren van de rechter laterale ventrikel zijn overgenomen uit de stereotactische atlas van Snieder en Niemer (1964) (4,25 mm van de mediaanlijn, 11 mm rostraal van de meatus-meatuslijn en 9.0 mm boven de meatus-meatuslijn). Voor het inbrengen van de meetnaald wordt een gat in de schedel geboord ( $\varnothing = 1,0$  mm) met behulp van een tandartsboor. De meetnaald ( $\varnothing = 0,8$  mm) heeft een stompe afgesloten punt en is 0,1 mm vanaf dit uiteinde doorboord (boorgat loodrecht op de lengterichting van de naald). Deze constructie verhindert het binnendringen van hersenweefsel tijdens het inbrengen van de naald in het ventrikel.

### 3.3.3 koelmethode

Links fronto-temporaal wordt met behulp van een trepaan een opening in de schedel aangebracht ( $\varnothing = 13$  mm) en wel zodanig, dat het trepaangat midden boven de gyri supra- en ectosylvii ligt. De coördinaten van het middelpunt van het gat zijn: 0,2 mm rostraal van de meatus-meatuslijn en 11 mm van de mediaanlijn. De dura blijft intact. Bot- en durabloedingen worden bestreden met beenwas en Spongostan (Ferrosan, Denemarken). De koelbout bestaat uit een zelftappend koperen huis met een roestvrij stalen bodemplaat. Deze bodemplaat is 0,5 mm dik. Het centrale kanaal dient om de afvoer van eventueel opgehoopt bloed tussen de bout en de dura te bevorderen (zie fig. 8). De bout wordt met behulp van een speciale sleutel in het boorgat gedraaid en wel zo diep, dat het juist op de dura rust. De luer-lock aansluitingen zorgen voor de verbinding via polyethyleen aan- en afvoerslangen met de ultrakryostaat (Lauda UK 40 T). De koelvloeistof is methanol. De ultrakryostaat pompt de koelvloeistof via de slangen door het koperen huis langs de dunne bodemplaat. Alle koelingen zijn uitgevoerd gedurende exact 5,0 minuten  $-30^{\circ}$  C.

Fig. 8. Positie van de koelthermode, geschroefd in het boorgat van de schedel. De koelthermode raakt de dura mater.

1. luer-lock aansluiting.
2. centraal kanaal.
3. schedel.
4. dura mater.



### 3.3.4 isolering van het oedeemvocht

#### *a. inleiding*

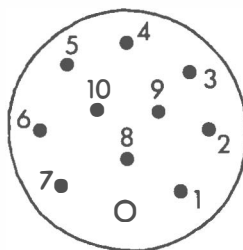
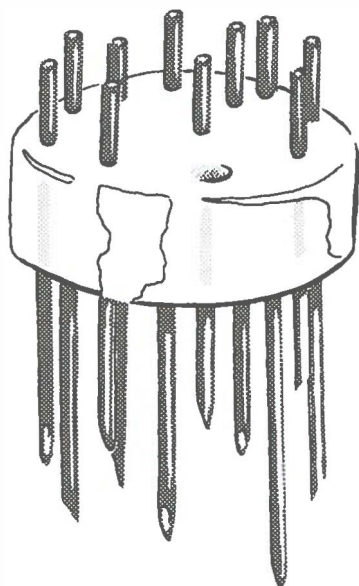
De in dit onderzoek beschreven methode is ontwikkeld door de afdeling Experimentele Neurochirurgie te Groningen (Go, 1976; Patberg, 1977). Deze methode is gebaseerd op de isolatie en het meten van de COP van subcutane vloeistoffen (Johnson, 1974; Fadnes, 1976) en op het meten van de interstitiële vloeistofdruk volgens de methode van Scholander (1968) en Snashall (1971) met behulp van de zgn. wickmethode (wick = bundel vezels). De isolatiemethode, ontwikkeld door Johnson (1974) berust op het gedurende één uur equilibreren met de ECF van subcutaan aangebracht bundels nylonvezel. Na snel verwijderen en centrifugeren van de vezels zijn kleine hoeveelheden ECF, die zich tussen de nylon filamenten bevinden, te isoleren. Bij het meten van de interstitiële (= hydrostatische) vloeistofdruk van de ECF volgens de Snashallmethode (1971) in katten met koude oedeem zag Patberg (1977) oedeemvocht in de met een wick gevulde catheter opstijgen. Dit principe is nu toegepast om primair oedeemvocht uit hersenweefsel te isoleren. De isoleeringsprocedure is zo ontwikkeld, dat gedurende een lange tijd een aantal opeenvolgende monsters op verschillende plaatsen uit het oedemateuze weefsel kan worden verkregen voor een nader onderzoek omtrent de samenstelling ervan.

#### *b. naaldenplaatje en toepassing*

In een schijf van acryl met een diameter van 12,8 mm en een dikte van 3,0 mm zijn 10 naalden (25 gauge Yale microlance; OD = 0,5 mm, ID = 0,3 mm) gelijmd. De lengte van de naalden varieert van 4 mm t/m 13 mm. De naalden steken 2 mm boven de acrylschijf uit. Aan de rand van de schijf is een schroefdraad gedraaid voor de bevestiging van de micromanipulatorarm van het stereotactisch toestel (zie fig. 9).

De naalden zijn zo geplaatst, dat de punten van de naalden nagenoeg in één vlak liggen. Dit vlak maakt een hoek van  $45^{\circ}$  met de acrylschijf (zie fig. 14). Aan het uiteinde van de vezelbundel ( $\emptyset = 0,25 - 0,30$  mm) wordt over een lengte van ongeveer vijf centimeter een kleine hoeveelheid cyanoacrylatlijm (Loctice Ltd, Ierland) gesmeerd. Dit nylonvezel (Enka Glanzstof, no. 940/140, type TgE9B) fungeert als wick en kan door de verstijving met de lijm eenvoudig in de naaldjes worden aangebracht. Aan de punt van de naald zorgt een uitstekend kwastje van de wick ervoor, dat de naalden tijdens het inbrengen in het weefsel niet verstopt raken. Het hersenweefsel kan gemakkelijk in de naald komen door de wick naar binnen te drukken. De aldus geprepareerde naalden worden één uur voor gebruik in aqua dest. gelegd, om de wick en de naaldjes met vloeistof te vullen. Dit is noodzakelijk om het oedeemvocht niet in contact te brengen met lucht (zie onder: vloeistofzegel). Na de koeling wordt met behulp van de micro-





naald nr. :	lengte in mm. :
1	4
2	7
3	11
4	13
5	12
6	8
7	5
8	6
9	9
10	10

Fig. 9. Acryl naaldenplaatje voor het isoleren van oedeemvocht. Om praktische redenen zijn de nummering en de lengte van de naaldjes niet met elkaar in overeenstemming te brengen.

manipulatorarm de naaldenschijf in de juiste positie boven het boorgat gebracht. De naalden worden zo snel mogelijk na de koeling in de hersenen gestoken. Polyethyleen slangetjes (PP25 Portex) met een lengte van ongeveer 15 cm worden vóór hun eigenlijke gebruik gevuld met petroleumether (soortgelijke dichtheid = 0,641) en aan één zijde afgesloten met een roestvrij stalen pennetje ( $\varnothing = 0,4$  mm). De petroleumether, waarin de slangetjes bewaard worden, fungeert als vloeistofzegel van het oedeemvocht. Ook hier is een dergelijk hulpmiddel noodzakelijk, omdat het isoleren van een monster soms meer dan een half uur duurt. Verdamping van een deel van het monster tijdens de isolatieprocedure zou chemische bepalingen (concentratiemetingen) nadelig beïnvloeden. De slangetjes worden direct na het plaatsen van het naaldenplaatje op de uiteinden van de naalden geplaatst. Hierna worden de roestvrij stalen pennetjes verwijderd.

Door de BBB-permeabiliteitsverhoging zal het oedeemvocht lichtblauw gekleurd worden door de intraveneus toegediende Evans blue (zie 1.5.4). Het in de slangetjes opstijgende, lichtblauw gekleurde oedeemvocht drukt de petroleumether uit de slangetjes. De petroleumether verdampt onmiddellijk in de buitenlucht. Nadat een slangetje gevuld is met oedeemvocht wordt het van het naaldje verwijderd, afgesloten aan beide zijden met de roestvrij stalen pennetjes en van een codering voorzien. Een nieuw slangetje kan op het naaldje geschoven worden. Dit ge-



schiedt ieder half uur. Indien een slangetje niet voldoende gevuld is, dan wordt het op zijn plaats gelaten. Na wederom een half uur te hebben gewacht wordt opnieuw beoordeeld, of het slangetje vervangen kan worden. Afhankelijk van de gewenste bepalingen op de vloeistofmonsters wordt de vulling van het slangetje voldoende geacht (voor COP-meting is  $\pm 5$  ul nodig, voor elektrolytbepalingen  $\pm 4$  ul en voor enzymactiviteitsmetingen  $\pm 6$  ul). Om die reden is berekend, dat 1 cm slangetje 0,88 ul vloeistof kan bevatten.

### 3.3.5 bepalingmethoden op oedeemvocht

#### *a. colloidotische drukmeting (COP)*

De kleine volumina der monsters (max. 15 ul) dwingt ons gebruik te maken van een membraan-colloidmosmometer voor kleine vloeistofmonsters ( $< 5$  ul). De perspex osmometer is gebouwd door de werkplaats van het Fysiologisch Laboratorium naar het model zoals beschreven is door Aukland en Johnsen (1974) (zie fig. 10). Als drukopnemer is een Statham vloeistofdrukopnemer (P23Gb; 0 - 75 cmHg, nr. 3728) ingebouwd. Het membraan, dat de referentiekamer en de monsterkamer scheidt is een Amicon membraan UM-10 ( $\emptyset = 3,5$  cm). Dit membraan laat slechts stoffen door met een molecuulgewicht kleiner dan 10.000. De osmometer wordt gecalibreerd met behulp van een watermanometer, die op de osmometer geschroefd kan worden.

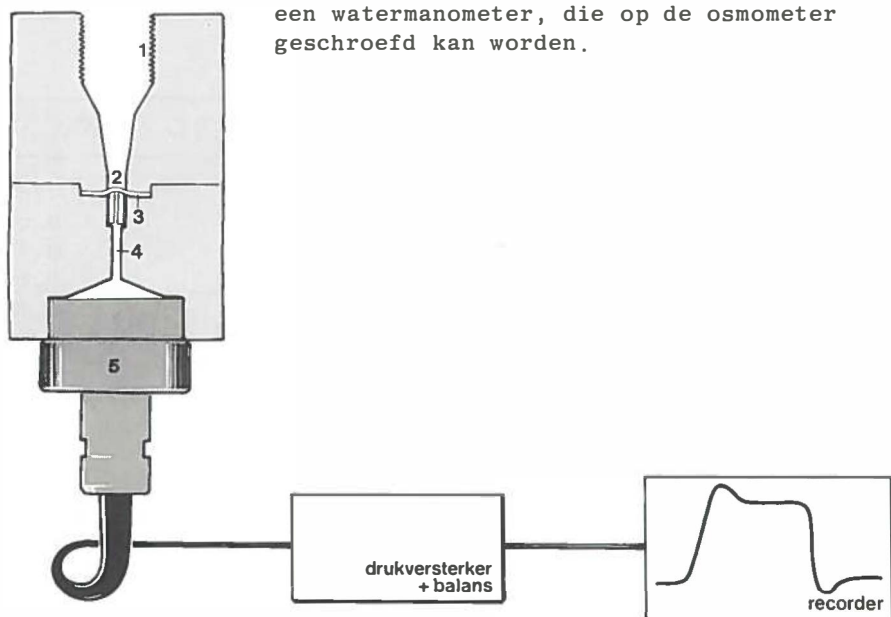


Fig. 10. Colloidotische drukmeter voor kleine vloeistofmonsters.  
 1. aansluiting voor watermanometer ter ijking. 2. monsterkamer.  
 3. membraan Amicon UM - 10. 4. referentiekamer. 5. Statham vloeistofdrukopnemer.

De metingen worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (21 - 23°C). De basislijn wordt verkregen door de monsterkamer, evenals de referentiekamer, te vullen met een isotone zoutoplossing. Deze zoutoplossing in de monsterkamer wordt voorzichtig verwijderd met behulp van vloeipapier en wordt vervangen door 4 - 5 ul te meten monster. Dit vloeistofmonster onttrekt colloïdosmotisch vocht aan de referentiekamer. De aldus opgebouwde onderdruk wordt geregistreerd op de recorder (papiersnelheid 1,0 cm/min). Na iedere meting wordt de monsterkamer met een isotone zoutoplossing gespoeld, totdat de basislijn weer wordt verkregen. Daarnaast vindt een regelmatige ijkings plaats tussen de metingen door met een ijkoplossing (6,92 gr bovine albumine in een isotone zoutoplossing). Op deze waarden worden alle metingen gecorrigeerd zodat alle COP-waarden onderling vergelijkbaar zijn.

#### *b. elektrolytenbepaling*

De elektrolytenbepaling wordt uitgevoerd op een "Perkin-Elmer double beam" atoomabsorptie-spectrofotometer. Daarvoor moet de verdunning van het vloeistofmonster ( 2 - 5 ul) geschieden met een 0,1% oplossing Lithium-chloride (1:100 v/v), omdat bij verdunning met aqua bidest. het aanwezige natrium storend werkt bij de kaliumbepaling. De uitslag wordt afgelezen op een ijklijn. Daarvoor dient een standaard oplossing van natrium = 140 mM en van kalium 5,0 mM.

Tabel XIX

ul	ijkoplossing	ml 0,1% LiCl	(Na <sup>+</sup> )relatief	(K <sup>+</sup> )relatief
12,5	+	5	17,5	0,625
10,0	+	5	14,0	0,500
7,5	+	5	10,5	0,375
5,0	+	5	7,0	0,250
2,5	+	5	3,5	0,125

Samenstelling van de ijkoplossing voor natrium en kalium voor het bepalen van de concentratie in de vloeistofmonsters. De natrium- en kaliumconcentratie uitgedrukt in mM.

Voor de elektrolytenbepaling in plasma geldt dezelfde procedure als voor oedeemvloeistofmonsters met uitzondering van de verdunningsfactor; deze is voor plasma 1:10 v/v. Voor de ijklijn dient derhalve een serie ijkoplossingen worden gemaakt, die een factor 10 hoger zijn dan in tabel XIX staat weergegeven. Voor iedere serie metingen dient opnieuw een ijklijn te worden gemaakt.

### c. lactaatdehydrogenase (LDH)

#### LDH-totaal

De bepaling van de LDH-activiteit in oedeemvocht en plasma wordt uitgevoerd met behulp van een "Biochemica test combination" (Boehringer, Mannheim). In tegenstelling tot de toegepaste concentraties, zoals beschreven door Patberg (1977) wordt de bepaling als volgt uitgevoerd:

3,00 ml oplossing I (fosfaatbuffer + pyruvaat) + oplossing II (NADH) levert een eindconcentratie van 50 mM fosfaatbuffer, 0,6 mM pyruvaat en 0,18 mM NADH met pH 7,5. Na toevoeging van 5  $\mu$ l monster aan oplossing I + II in een 1 cm kwartscuvet wordt snel gemengd en binnen 30 sec de extinctie afgelezen in een spectrofotometer (Gilford, no. 240) bij 365 nm. De volume-activiteit is  $190900 \times \Delta E_{365}/\text{min}$ , uitgedrukt in U/l. Volume-activiteit is de enzymactiviteit per volume-eenheid. Per definitie is één eenheid de enzymhoeveelheid, die onder zo mogelijk optimale meetvoorwaarden in 1 min 1  $\mu$ Mol substraat omzet. De eenheid wordt afgekort door U (=unit).

#### Testprincipe:



De reactie verloopt naar de kant van het lactaat. De LDH-activiteit wordt bepaald uit de snelheid van de NADH afname.

#### LDH-iso-enzymen

De LDH-iso-enzymactiviteit is bepaald met 1 - 2  $\mu$ l monster. De scheiding is uitgevoerd met behulp van de agarosegel elektroforesetechniek (gemodificeerd naar Johansson 1972). 25 ml van een agarose-agaroplossing (0,8% resp. 0,1%) opgelost in een Veronal-Natriumbuffer (0,05 M, pH = 8,36) wordt bij 60°C uitgenomen op glasplaten (110 x 205 x 1,5 mm), die vooraf gecoat zijn met een eenzelfde agarose-agaroplossing. Gekozen is voor een mengsel van agarose en agar, omdat één van de iso-enzymen op de opbrengplaats bleef zitten tijdens proeven met 0,9% agarose. De elektro-endosmotische eigenschappen van agar laten dit iso-enzym iets naast de opbrengplaats terecht komen, zodat scannen van de bandjes geen problemen geeft. Nadat de gel zich gevormd heeft wordt de glasplaat op een met water gekoelde elektroforsetafel gelegd waar vooraf 5  $\mu$ l aqua dest. is uitgegoten voor een goede temperatuursgeleiding. Glasplaten met een agaroseoplossing (1½%) en losse strips van eenzelfde oplossing zorgen voor het elektrisch contact tussen beide buffercompartimenten (De buffercompartimenten zijn gevuld met Veronal-Natriumbuffer, 0,1M pH = 8,6).

Nadat de opstelling gemaakt is, zoals in fig. 11 is weergegeven, worden 15 -18 sleufjes in de gel gemaakt door smalle strookjes filtreerpapier rechtop in de gel te steken en wel

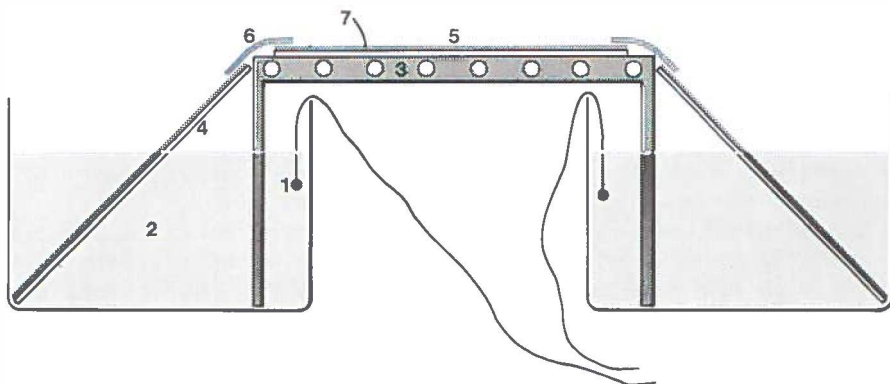
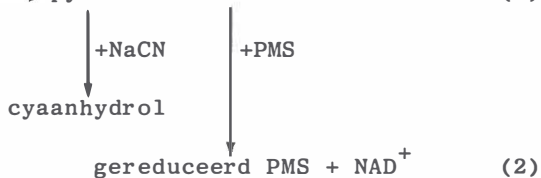


Fig. 11. Doorsnede elektroforese-apparatuur.

1. elektrode. 2. buffercompartiment. 3. elektroforesetafel (watergekoeld). 4. glasplaat met agrose (1½%) voor stroomgeleiding. 5. glasplaat, met agrose (0,9%) voor elektroforetische scheiding. 6. agrose-strip zorgt voor elektrisch contact tussen de buffercompartimenten. 7. strookje filtreerpapier voor het maken van de opbrengplaats.

zo diep, dat zij de glasplaat niet raken. 3 min na plaatsing worden de papiertjes verwijderd en de zo ontstane sleufjes gevuld met 1 - 2 ul monster. De elektroforetische scheiding duurt 50 min (potentiaal gradiënt 20 - 25 V/cm; 80 - 100 mA). De glasplaten worden daarna 2 uur geïncubeerd in een donkere stoof bij 37°C.

Hierbij treedt de volgende reactie op:



nitro BT = nitroblauwtetrazolium (kleurloos)

gereduceerd nitro BT (violet)

PMS = phenazinemethosulfaat

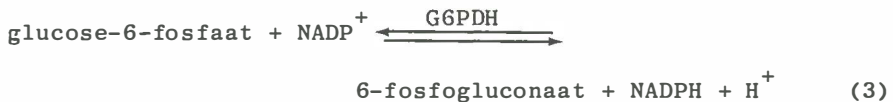
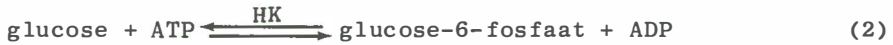
Het principe van de kleurreactie berust op het aantonen van NADH. Na fixatie (96% ethanol, ijsazijn, aqua dest.; 15:1:4 v/v/v) en het drogen van de gel wordt de glasplaat gescanned met behulp van een densitometer (gelman Scanner R + integrator).

#### *d. creatine-fosfokinase (CPK)*

##### *CPK-totaal*

De CPK-activiteit wordt bepaald in 5 ul monster met behulp van "Biochemica Test Combination" (Boehringer, Mannheim) volgens de UV-methode (365 nm).

##### Testprincipe:



De enzymreactie (1) verloopt van links naar rechts: de CPK-activiteit wordt gemeten door de snelheid van de ATP-vorming, die in aanwezigheid van glucose bepaald wordt in de hulpreactie (2). Deze reactie wordt gekatalyseerd door hexokinase (HK). Glucose-6-fosfaat wordt in aanwezigheid van de NADP omgezet in 6-fosfogluconaat en NADPH (reactie 3).

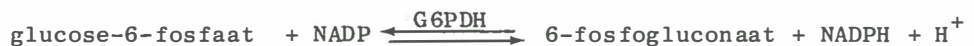
De uitvoering geschiedt volgens het voorschrift van de testset. Volumeactiviteit is  $155420 \times \Delta E_{365} / \text{min (U/l; } 25^{\circ}\text{C)}$ .

##### *CPK-iso-enzymen*

De bepaling van de relatieve verdeling der CPK-iso-enzymen is identiek aan de beschreven materialen en methoden voor de scheiding van de LDH-iso-enzymen (3.3.5.c) met uitzondering van de incubatievloeistof.

De samenstelling van de incubatievloeistof en de kleuringsreactie geschiedt, zoals is beschreven door Van der Veen en Willebrand (1966).

##### Testprincipe:



### 3.3.6 impedantiemeting

Voor het onderzoek naar de uitbreidingssnelheid van het oedeem-vocht in de witte stof met behulp van impedantiemetingen hebben wij een speciale meetnaald ontworpen en gebouwd. De naald bestaat uit een gegoten kern van Araldit D.

Voordat de vijf roestvrij stalen ringetjes ( $ID = 0,9$  mm,  $OD = 1,3$  mm, hoogte =  $0,5$  mm) in de gietmal worden geplaatst zijn er geïsoleerde koperdraden ( $\varnothing = 0,2$  mm) aan de binnenzijde van de ringetjes gesoldeerd. De afstanden van de ringetjes 1 t/m 5 zijn resp. 2,0; 3,2; 2,6 en 2,5 mm. De referentienaald is een platinadraad ( $\varnothing = 0,7$  mm) en is bevestigd aan een acrylschijf ( $\varnothing = 12,8$  mm) met een schroefdraad voor de bevestiging van de schijf aan de micromanipulatorarm van het stereotactisch toestel. De meetnaald is eveneens bevestigd aan een even grote acrylschijf met een gat aan de rand, waardoor de arm is gestoken. De arm fungeert als geleider (zie fig. 12). De afstand van de referentienaald tot aan de ringetjes is overal 4,0 mm.

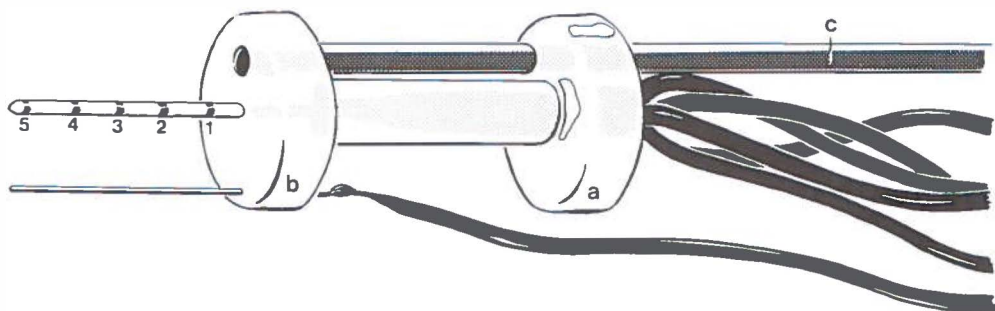


Fig. 12. Impedantie - en referentienaald, gemonteerd op acrylplaatjes (resp. a en b). De micromanipulatorarm (c) houdt de platen in de juiste positie. De arm dient als geleider voor plaatje a. Na het in het hersenweefsel aanbrengen van de referentienaald, kan de meetnaald door het centrale gat van plaatje b in de hersenen worden gestoken.

Direct na de koeling wordt de acrylschijf (b) met de referentienaald in het boorgat aangebracht. Door het centrale gat wordt de dura aangeprikt en de meetnaald voorzichtig in de hersenen gestoken en wel zodanig, dat beide naalden in één winding zijn aangebracht (zie fig. 13). De koperdraadjes zijn verbonden met een schakelkastje, waarmee op ieder gewenst tijdstip de impedantie gemeten kan worden van de weefselgebiedjes, die zich tussen de ringetjes en de referentienaald bevinden.

De generator (Philips PM 5168) levert een frequentie van 750 Hz. De impedantie wordt afgelezen op een voltmeter (UNIGOR-A43) en geeft de waarden weer in  $K \Omega$ . Een ingebouwde schakeling voor het meten van de fasehoek is tijdens de proeven niet gebruikt, daar met behulp van een oscilloscoop door ons is bepaald, dat de faseverschuiving niet meetbaar was en derhalve verwaarloosbaar klein moet zijn (zie ook 1.9.1).

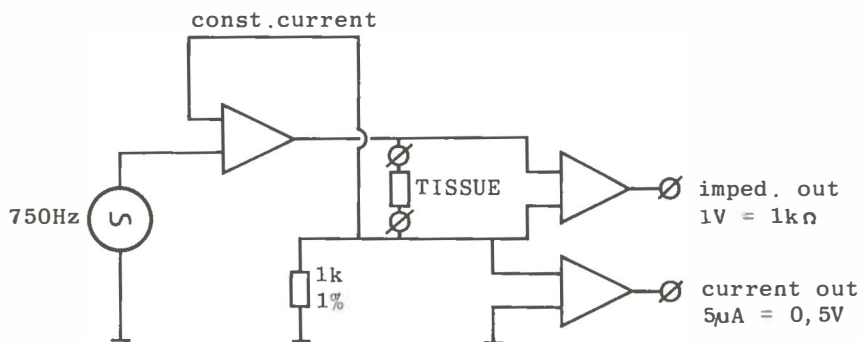
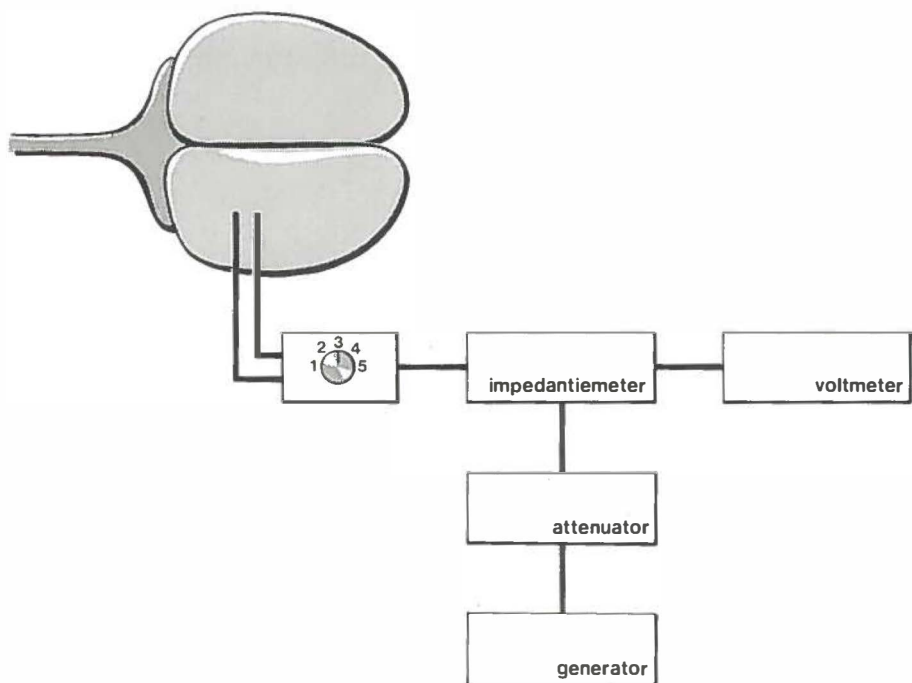


Fig. 13. Blokschema van de impedantiemeting. De twee elektroden bevinden zich in één winding.

### 3.3.7 statistiek

#### *a. inleiding*

Bij het verwerken van de resultaten zal gebruik worden gemaakt van statistische methoden. De belangrijkste toe te passen statistische hulpmiddelen worden beschreven en - indien nodig - toegelicht aan de hand van een voorbeeld, berustend op getallenmateriaal uit de experimenten.

#### *b. gemiddelde en standaarddeviatie*

Een  $n$ -tal waarnemingen  $x_1, \dots, x_n$  kan worden samengevat met behulp van het gemiddelde

$$\bar{x} = n^{-1} \sum_{i=1}^n x_i = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)/n \quad (1)$$

en de steekproefvariantie

$$S^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot (n-1)^{-1} \quad (2)$$

Het gemiddelde zegt iets omtrent de plaats waar de  $n$  scores zich bevinden. De steekproefvariantie  $S^2$  is een spreidingsmaatstaf. De variantie heeft een dimensie, die het kwadraat is van de oorspronkelijke waarnemingen.

Daarom gebruikt men liever de steekproefstandaarddeviatie

$$SD = (S^2)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

als spreidingsmaatstaf.

#### *c. toets van Friedman*

Om te onderzoeken of er correlatie bestaat tussen  $m$  rangschikkingen  $\{(r_{i1}, \dots, r_{in_i}); i=1, \dots, m; r_{ij}$  is het rangnummer van de  $j$ -de waarneming bij de  $i$ -de rij} wordt gebruik gemaakt van Friedman's toets voor overeenkomst tussen  $m$  rangschikkingen. Hierbij wordt de nulhypothese

$H_0$  : "voor iedere rangschikking is de volgorde van de  $n$  waarnemingen op aselechte en van de overige rangschikkingen onafhankelijke wijze tot stand gekomen"

getoetst tegen de alternatieve hypothese

$H_1$  : "er bestaat een zekere overeenstemming tussen de volgorde der rangschikkingen".

De Friedman toets, als beschreven in Rümke en Van Eden



(1961), is gebaseerd op de toetsgrootheid

$$C = 12 S / mn(n+1), \quad (4)$$

waarbij

$$S = \sum_{i=1}^n \left[ \sum_{j=1}^m r_{ij} - \frac{1}{2}m(n+1) \right]^2. \quad (5)$$

Merk op, dat hoe groter  $S$  wordt des te onwaarschijnlijker de nulhypothese is. De verdeling van  $C$  onder de nulhypothese  $H_0$  laat zich zeer goed benaderen door de chi-kwadraat verdeling met  $v=(n-1)$  vrijheidsgraden. Daarom wordt de nulhypothese  $H_0$  verworpen ten gunste van de alternatieve hypothese  $H_1$ , indien  $C$  groter is dan de kritieke waarde met rechter overschrijdingskansen  $\alpha$  uit de chi-kwadraatverdeling met  $(n-1)$  vrijheidsgraden. De bovenstaande theorie is gebaseerd op de onderstelling, dat bij geen der  $m$  rangschikkingen zogenaamde "knopen" optreden, dat wil zeggen "gelijke waarden". Indien dit wel het geval is, dan wordt het gemiddelde rangnummer toegekend, waarbij  $S$  op dezelfde wijze wordt berekend met behulp van formule (5). De formule (4) voor de berekening van  $C$  wordt dientengevolge aangepast en vervangen door formule (6)

$$C = S \cdot \left[ 12^{-1} \cdot mn(n+1) - (n-1)^{-1} \cdot T \right]^{-1}, \quad (6)$$

waarbij

$$T = 12^{-1} \sum_{i=1}^m \left[ \sum_{k=1}^{k_i} t_{ih}^3 - n \right], \quad (7)$$

waarin  $t_{j1}, \dots, t_{ik_i}$  de knoopgrootten voorstellen bij de  $j$ -de rangschikkingen. De notatie van de toetsingsgrootheid is  $C_{\alpha}$ . Voor een goedoverzicht van de toepassing van deze toets zij verwezen naar Rümke en Van Eeden (1961).

#### *d. toets van Kendall*

Voor het bewerken van de uitslagen van de bepalingen op oedeemvocht is gebruik gemaakt van een toets voor het combineren van  $m$  rangcorrelatietoetsen van Kendall, verder te noemen de gemodificeerde toets van Kendall voor rangcorrelatie. Deze toets is van toepassing op  $m$  rangschikkingen  $\{(r_{i1}, \dots, r_{in_i}); i=1, \dots, m; m \geq 2, \text{ waarbij } r_{ij} \text{ het rangnummer is van de } j\text{-de waarneming bij de } i\text{-de rij}\}$ . Deze  $m$  rangschikkingen hebben steeds een wisselend aantal elementen, dit in tegenstelling tot de  $m$  rangschikkingen, waarop de toets van Friedman wordt toegepast. Hierbij wordt de nulhypothese

$H_0$  : " voor ieder rangschikking is de volgorde van de  $n$  waar-

nemingen op aselechte en van de overige rangschikkingen onafhankelijke wijze tot stand gekomen"

getoetst tegen de alternatieve hypothese

$H_1$  : " er bestaat een zekere overeenstemming tussen de m rangschikkingen met dien verstande, dat er een neiging tot eenzelfde verloop der rangnummers bestaat, dat wil zeggen steeds een neiging tot stijging of steeds een neiging tot dalen".

Als voorbeeld voor het uitvoeren van deze toets gebruiken wij hier het getallenmateriaal van de vloeistofmonsters uit het naaldje van 6 mm lengte voor het bepalen van de COP (zie onderstaande tabel). De onderstreepte getallen zijn de per kat toegekende rangnummers naar opklimmende grootte van de vermelde scores.

Tabel XX

Tijd (min)	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	$U_i$
Kat no.											
26		<u>7<sup>1</sup></u>	<u>8<sup>2</sup></u>	<u>9<sup>3</sup></u>	<u>10<sup>4½</sup></u>			<u>10<sup>4½</sup></u>			2,27
27	<u>7<sup>1½</sup></u>	<u>7<sup>1½</sup></u>	<u>9<sup>3</sup></u>	<u>12<sup>4½</sup></u>					<u>12<sup>4½</sup></u>		2,09
29	<u>2<sup>1</sup></u>			<u>14<sup>2</sup></u>			<u>15<sup>3</sup></u>				1,57
32			<u>11<sup>3½</sup></u>	<u>11<sup>3½</sup></u>	<u>12<sup>7</sup></u>	<u>11<sup>3½</sup></u>	<u>11<sup>3½</sup></u>	<u>11<sup>3½</sup></u>	<u>11<sup>3½</sup></u>		-0,12
35		<u>7<sup>1</sup></u>	<u>13<sup>2</sup></u>		<u>14<sup>3</sup></u>		<u>17<sup>5½</sup></u>		<u>16<sup>4</sup></u>	<u>17<sup>5½</sup></u>	2,29
41	<u>4<sup>1</sup></u>			<u>11<sup>2</sup></u>			<u>13<sup>3</sup></u>				1,57
42	<u>7<sup>1</sup></u>				<u>12<sup>3</sup></u>				<u>11<sup>2</sup></u>		0,57
44	<u>6<sup>1</sup></u>		<u>11<sup>2½</sup></u>			<u>11<sup>2½</sup></u>			<u>12<sup>4</sup></u>		1,81

COPoedeemvocht uit naald 6 mm lengte van m=8 katten, gemeten op n=10 tijdstippen. De onderstreepte getallen geven de rangnummers naar opklimmende grootte weer.  $U_i$  is een toetsgrootte (zie onder).

Onze toets wordt als volgt uitgevoerd. Per rangschikking wordt de waarde bepaald van de toetsgrootte  $S_i$  voor Kendall's toets voor rangcorrelatie. De waarnemingsparen  $r_{ij}$  en  $r_{ij'}$  worden in ons voorbeeld gevormd door een waarnemingsreeks en een reeks, gevormd door de rangnummers in de volgorde waarin de waarnemingen zijn gedaan.  $S_i$  stelt voor het aantal - van alle  $\frac{1}{2}n_i(n_i-1)$  paren - waarnemingen, waarvoor geldt, dat  $r_{ij} < r_{ij'}$ , en  $j < j'$ , verminderd met het aantal paren  $r_{ij} > r_{ij'}$ . Vervolgens wordt  $U_i$  voor iedere rangschikking ( $U_1, \dots, U_m$ )  $ij$  gedefinieerd, waarvoor geldt, dat zij - onder de nulhypothese

- allen verwachtingswaarde 0 en variantie 1 hebben. Wanneer er gelijke rangnummers voorkomen in een rangschikking ("knoopen"), dan wordt het gemiddelde rangnummer toegekend. De berekening van  $U_1$ , zowel met als zonder knooppcorrectie, is uitgevoerd volgens de methode, beschreven door Rümke en Van Eeden (1961) met dien verstande, dat de continuïteitscorrectie en het absoluutteken vervalt.

Onder stijgend of dalend verloop verwachten wij een positief resp. negatief teken voor  $U_1$ . De verschillende  $U_i$ 's worden samengevat in de nieuwe toetsgrootheid

$$K = \sum_{i=1}^m U_i \cdot m^{-\frac{1}{2}} \quad (8)$$

die vervolgens wordt getoetst in de standaard normale verdeling. Daar wij in onze formulering van de alternatieve hypothese  $H_1$  geen uitspraak hebben gedaan omtrent de richting van het verloop (stijgend of dalend) wordt tweezijdig getoetst. Bij deze toetsing met een onbetrouwbaarheidsdrempel  $\alpha = 5\%$  wordt de nulhypothese verworpen ten gunste van  $H_1$ , indien

$$|K| \geq 1,96 \quad (9)$$

In ons voorbeeld zijn in de laatste kolom van tabel XX de  $U_i$ 's weergegeven. Met uitzondering van kat no. 32 geven alle uitkomsten van  $U_i$  een stijgend verloop aan. Formule (9) toegepast vinden wij, dat

$$K = \sum_{i=1}^m U_i \cdot m^{-\frac{1}{2}} = 12,05/8^{\frac{1}{2}} = 4,26.$$

Dit betekent, dat er een significante stijging is aangetoond voor de COP<sub>oedeemvocht</sub> uit naaldje 6 mm.

#### *e. toetsen van Wilcoxon*

Op het getallenmateriaal van de liquormonsters is de Wilcoxon-toets voor twee steekproeven toegepast. Daarnaast is de toets zeer geschikt voor het beantwoorden van de vraag, of er significante verschillen aantoonbaar zijn op het tijdstip t tussen de oedeemvochtsamenstelling van de witte en de grijze stof. Hiervoor is het echter wel noodzakelijk "at random" een proefdier te kiezen op tijdstip t voor het bepalen van de vloeistofsamenstelling van ieder naaldje, opdat de monsters uit de witte en de grijze stof uit verschillende proefdieren afkomstig zijn. Tot een dergelijke procedure zijn wij gedwongen, omdat het onvoldoende voorkomt, dat bij eenzelfde proefdier op tijdstip t zowel uit de witte en de grijze stof monsters worden verkregen. Tevens zal de toets gebruikt worden om - indien aanwezig - significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende series proefdieren.

Hierbij wordt de volgende nulhypothese getoetst

$H_0$ : "onderling onafhankelijke waarnemingen van de ene steekproef( $x_1, \dots, x_p$ ) en onderling onafhankelijke waarnemingen van de andere steekproef( $y_1, \dots, y_q$ ) zijn afkomstig uit dezelfde populatie, zodat alle volgorden van de  $(p+q)$  elementen van beide steekproeven even waarschijnlijk zijn."

Het doel van de toets is om na te gaan of de nulhypothese bij een gekozen onbetrouwbaarheidsdrempel  $\alpha$  kan worden verworpen ten gunste van de alternatieve hypothese

$H_1$ : "de twee genoemde steekproeven zijn niet afkomstig uit dezelfde populatie".

Voor het onderzoek naar het stijgend of dalen verloop van één der parameters van plasma (COP, elektrolyten, enzymen,  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine) is naast de toets van Friedman ook de symmetrietoets van Wilcoxon toegepast.

Hierbij wordt de nulhypothese

$H_0$ : "het verschil tussen de eerste en de daaropvolgende waarneming is afkomstig uit een verdeling, die symmetrisch is ten opzichte van nul"

getoetst tegen de alternatieve hypothese

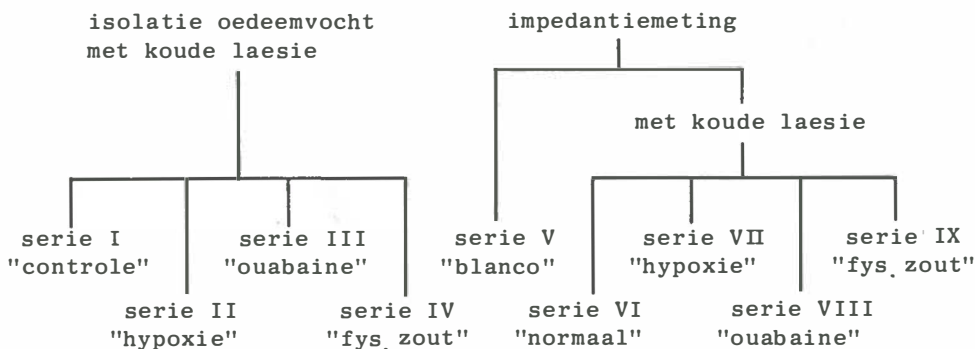
$H_1$ : "de verdeling is niet symmetrisch rond het nulpunt en vertoont de neiging naar één kant (positief of negatief) verschoven te zijn."

De symmetrietoets zal worden toegepast op paren uitslagen met tijdsintervallen van één uur of met een tijdsinterval van vijf uur. In het laatste geval gaat het om de uitslagen van  $t=0$  en van  $t=5$  uur.

# 4 resultaten & discussie

## 4.1 inleiding

De proefdieren zijn aan de hand van de uitgevoerde experimenten te verdelen in twee hoofdgroepen en negen subgroepen (serie I t/m IX)



Bij een aantal proefdieren werd oedeemvocht geïsoleerd, terwijl het dier gedurende het experiment spontaan ademde (serie I "controle") of werd beademd om hypoxie te kunnen induceren (serie II "hypoxie"). Eveneens werd de invloed van intracerebraal geïnjecteerde ouabaine (serie III "ouabaine") of isotoon zout (serie IV "fysiologisch zout") onderzocht. Met fysiologisch zout wordt hier bedoeld een isotone zoutoplossing van 0,9% NaCl in aqua dest. De resultaten van de oedeemvochtanalyse zullen apart worden behandeld met voor iedere serie aansluitend de conclusie en discussie. Aan het einde van de vier series isolatieproeven zal het onderlinge verband tussen deze series worden besproken. Na de resultaten en discussies van de isolatieproeven volgen die van de impedantiemetingen. Deze metingen werden uitgevoerd op een serie proefdieren zonder toebrengen van een koude laesie (serie V "blanco") als ook op vier series proefdieren met een koude laesie onder omstandigheden, zoals vermeld bij de series I t/m IV (zie bovenstaand schema). Hierna volgt een korte beschouwing omtrent het onderlinge verband tussen de series impedantieproeven, in het bijzonder de voortplantingssnelheid van het oedeemvocht in het hersenweefsel.

Door het stereotactisch plaatsen van het naaldenplaatje komen punten van overeenkomstige naalden bij verschillende katten in nagenoeg dezelfde hersengebiedjes terecht. Zodoende kunnen de eigenschappen van vloeistofmonsters uit overeenkomstige naaldjes bij verschillende proefdieren onderling worden vergeleken. Het tijdstip van isolering der monsters, gerekend vanaf het toebrengen van de koude laesie, wordt hierbij natuurlijk in acht genomen. Bij geen enkele kat leverden alle naaldjes vloeistofmonsters. Het aantal naaldjes dat iets opleverde varieerde bij onze 54 katten van 2 tot en met 8. Enkele naaldjes stopten reeds vóór het einde van het experiment met het leveren van monsters, andere naaldjes startten hun vloeistofproductie pas tegen het einde van het experiment. Uit de hersencoupees van alle proefdieren, gesneden in en loodrecht op het transversale vlak (zie 3.1) bleek, dat de punten van de naalden 6 en 7 mm zich in de grijze stof van de onbeschadigde cortex bevonden, terwijl de punt van de naald 13 mm in de grijze stof van het claustrum terecht kwam. De punten van de overige naalden zaten in de witte stof (zie figuur 14).

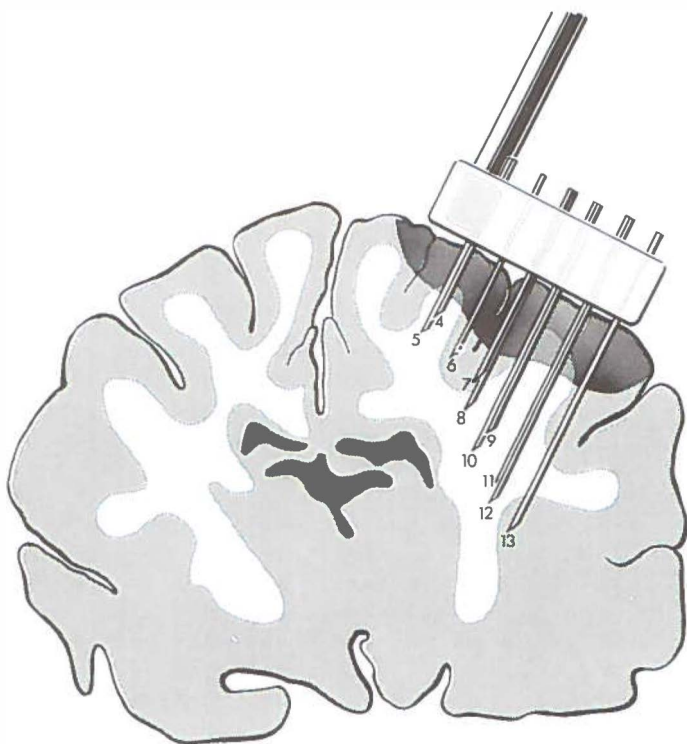


Fig. 14. De positie van de tien naaldjes in de kattehersenen na toediening van de koude laesie. De naaldjes zijn geprojecteerd in het transversale vlak dat door het midden van het naaldenplaatje en de micro-manipulatorarm loopt. Het gelaedeerde gebied in de cortex is donker weergegeven.



Figuur 15 Macroscopisch aspect van de corticale laesie op de linker hemisfeer. Op de rechter hemisfeer is de plaats van de naald voor de ventrikeldrukmeting zichtbaar



Figuur 16 Hersencoupe, gesneden in het transversale vlak. Het necrotische weefsel in het corticale gebied is duidelijk zichtbaar. De witte stof is donker gekleurd door het Evans blue in het oedeemvocht. De pijl geeft de positie aan van naaldje 4 mm

## 4.2 serie I "controle"

### 4.2.1 colloidosmotische druk (COP) controle serie

#### *Plasma*

Van iedere kat werd op verschillende tijdstippen van arteriële bloedmonsters 5 ul gebruikt voor het bepalen van de COP.

Tabel 1 geeft een samenvatting van de waarnemingen.

Tabel 1 COP<sub>plasma</sub>, uitgedrukt in mmHg

tijd	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
$\bar{x}$	20,4	19,2	18,9	19,1	18,7	18,2
SD	3,0	2,8	2,5	2,5	2,4	2,2
N	20	20	20	20	20	20
		(S)	(S)	(NS)	(S)	(S)

Gemiddelde waarden ( $\bar{x}$ ) met steekproefstandaarddeviaties (SD) op verschillende tijdstippen, gemeten bij twintig katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er significante (S) en niet-significante (NS) verschillen gevonden tussen de opeenvolgende tijdstippen (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is een *sterke daling* van de COP<sub>plasma</sub> gevonden, gezien de uitkomst van de symmetrietoets van Wilcoxon (significantieniveau  $\alpha = 0,0001$ ).

Voorts bestaat er een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de COP<sub>plasma</sub> bij twintig katten met een globale daling. Toepassing van de toets van Friedman levert namelijk een  $C_{\text{plasma}} = 23,6$  (volgens de tabellen van de chi-kwadraatverdeling is  $C_{5;0,01} = 15,1$ ).

#### *Oedeemvocht*

Ieder half uur na het toebrengen van de koude laesie werden oedeemvochtmonsters geïsoleerd. Indien er op één van die tijdstippen een of ander capillair onvoldoende gevuld was (dit wil zeggen voor minder dan 7 cm), dan werd deze capillair met rust gelaten. Na een half uur kwam deze capillair opnieuw in aanmerking om vervangen te worden. Indien een naaldje in een half uur zoveel oedeemvocht produceerde, dat er meerdere capillairen werden gevuld, dan werd alleen die capillair in de berekening opgenomen, die het dichtst bij de voorgeschreven verzameltijden gevuld was. Van ieder naaldje werden de mon-



sters op de voorgeschreven tijdstippen verzameld en de COP-uitslagen getabelleerd. In 3.3.7.d werd aan de hand van een voorbeeld duidelijk gemaakt, hoe de gemodificeerde toets van Kendall op dergelijk getallenmateriaal toegepast kan worden. Daar werd namelijk  $\sum U_i$  en K berekend voor naaldje 6 mm. In tabel 2 zijn  $\sum U_i$  en K voor alle naaldjes samengevat.

Tabel 2.  $\sum U_i$  en K voor COP<sub>oedeemvocht</sub> van de naaldjes in de witte en de grijze stof

diepte (mm)	witte stof							grijze stof		
	4	5	8	9	10	11	12	6	7	13
$\sum U_i$	-11,43	-11,70	-8,32	-12,01	-10,43	-13,48	-12,18	12,05	13,94	10,54
K	- 4,42	- 4,42	-3,71	- 4,24	- 4,26	- 4,27	- 4,60	4,26	4,65	3,98

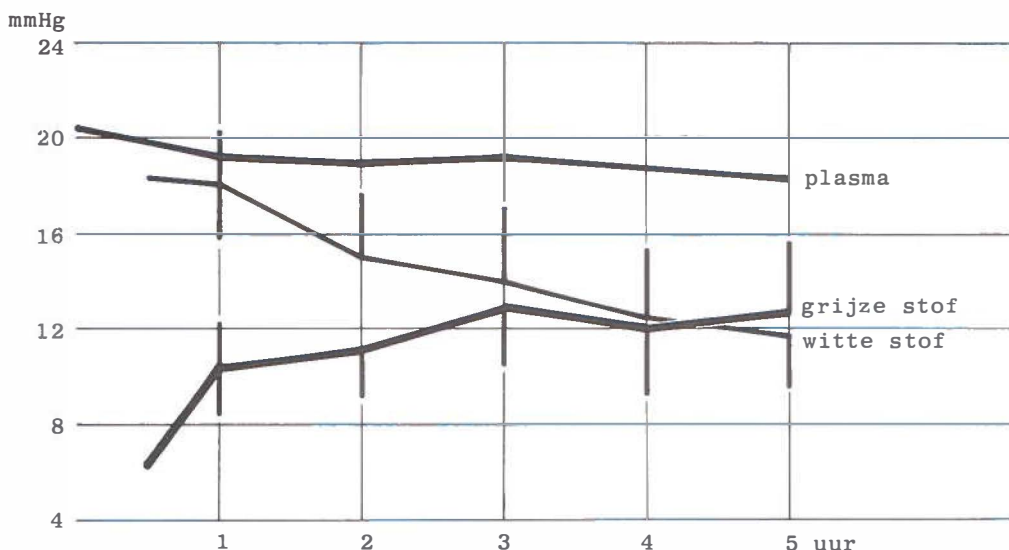
$\sum U_i$  en K zijn toetsingsgrootheden. Voor de berekening en de betekenis ervan zij verwezen naar 3.3.7.d

Er is in de witte stof sprake van een *sterke daling* en voor de grijze stof een *sterke stijging* in het verloop van de COP getuige het teken en de waarden van de toetsingsgrootheid K. Om een indruk te krijgen van het verloop van de COP in oedeemvocht van witte en grijze stof zijn de gemiddelden en de SD berekend op zes verschillende tijdstippen, uitgaande van alle naaldjes die op dat tijdstip iets leverden, en weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. COP<sub>oedeemvocht</sub> (mmHg), geïsoleerd uit de witte en de grijze stof

		tijd (min)	30	60	120	180	240	300
grijze stof	$\bar{x}$		6,2	10,1	11,3	12,9	12,0	12,7
	SD		2,1	2,2	2,2	2,4	2,8	2,8
			(S)	(S)	(S)	(NS)	(NS)	(NS)
witte stof	$\bar{x}$		18,3	18,0	15,0	14,0	12,4	11,8
	SD		2,6	2,1	2,6	3,0	2,9	2,0
			(S)	(S)	(S)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde en SD voor COP, uitgedrukt in mmHg, respectievelijk voor naalden in de grijze en de witte stof. NS en S geven aan of er sprake is van een niet-significant of significant resultaat bij de toepassing van de Wilcoxon twee steekproeven-toets (tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ )



Grafiek 1. Verandering van de COP voor plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

#### 4.2.2 natrium controle serie

##### *Plasma*

Van iedere kat werd op verschillende tijdstippen van arteriële bloedmonsters 50 ul gebruikt voor het bepalen van de  $(Na^+)$ . Tabel 4 geeft een samenvatting van de waarnemingen.

Tabel 4. Natriumconcentratie in plasma, uitgedrukt in mM

tijd	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
$\bar{x}$	145,2	144,7	146,0	144,3	144,1	143,2
SD	4,8	5,2	5,7	7,5	6,8	8,4
N	30	30	30	30	30	30
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde waarden ( $\bar{x}$ ) met steekproefstandaarddeviaties (SD) op verschillende tijdstippen, gemeten bij dertig katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er niet-significante (NS) verschillen gevonden tussen de opeenvolgende tijdstippen (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is *geen verandering* van de ( $\text{Na}^+$ ) gevonden tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er kan ook *geen overeenstemming* tussen het verloop van de ( $\text{Na}^+$ ) worden aangetoond na de koude laesie bij dertig katten (toets van Friedman met  $C_{\text{plasma}} = 2,06$ ; volgens de tabellen van de chi-kwadraatverdeling is  $C_{5;0,01} = 15,1$ ).

### Oedeemvocht

Op monsters van oedeemvocht werd dezelfde procedure (half-uurlijkse afname en de berekening) toegepast als in 4.2.1 met dien verstande dat thans de ( $\text{Na}^+$ ) oedeemvocht wordt bepaald. Van naaldje 4 mm was helaas geen enkel vloeistofmonster beschikbaar.

In tabel 5 zijn de  $\sum U_i$  en K voor negen naaldjes samengevat.

Tabel 5.  $\sum U_i$  en K voor de natriumconcentratie in oedeemvocht van naaldjes in de witte en de grijze stof.

diepte (mm)	witte stof							grijze stof		
	4	5	8	9	10	11	12	6	7	13
$\sum U_i$	-	1,00	0,68	2,18	0,40	0,99	-6,38	2,81	-3,17	-1,19
K	-	0,58	0,34	0,89	0,15	0,30	-2,13	1,25	-1,59	-0,84

$\sum U_i$  en K zijn toetsingsgrootheden. Voor de berekening en de betekenis ervan zijn verwezen naar 3.3.7.d

De meeste naaldjes in de witte en de grijze stof tonen *geen significante verandering* in het verloop van de ( $\text{Na}^+$ ) bij de verschillende katten. Voor naaldje 12 mm wordt een verandering gevonden ( $K = -2,13$ ) hetgeen wijst op een daling. Omdat het hier enkel slechts één naaldje betreft uit de gehele serie mag niet veel waarde aan zo'n incidentele significantie worden toegekend.

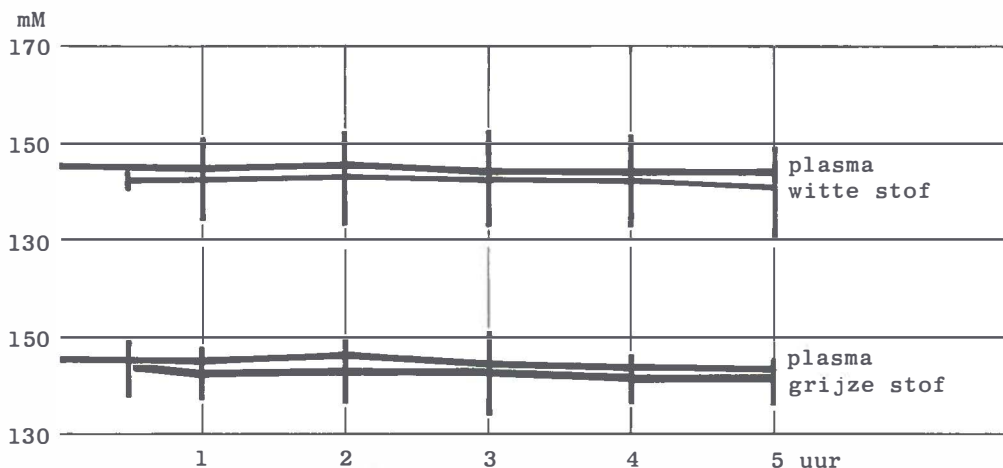
Tabel 6 geeft een samenvatting van de gemiddelden en de SD van de ( $\text{Na}^+$ ) in oedeemvocht, verkregen op verschillende tijdstippen na de koude laesie uit witte en grijze stof.

Tabel 6. Natriumconcentratie in oedeemvocht (mM), geïsoleerd uit de grijze en de witte stof.

	tijd (min)	30	60	120	180	240	300
grijze stof	$\bar{x}$	143,5	142,3	143,8	143,1	141,6	142,0
	SD	6,3	3,4	5,6	8,4	3,6	2,8
witte stof	$\bar{x}$	142,0	142,5	142,9	143,0	142,9	140,9
	SD	1,4	8,1	9,7	9,6	9,8	9,8
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde en SD voor de natriumconcentratie, uitgedrukt in mM, respectievelijk voor naalden in de grijze en de witte stof. NS geeft aan, dat er nimmer significantie kon worden verkregen bij de toepassing van de Wilcoxon twee steekproeven-toets (tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ )

Om een indruk te krijgen van het verloop van de natriumconcentratie in witte en grijze stof en in plasma zijn de waarden uit de tabellen 4 en 6 uitgezet in grafiek 2.



Grafiek 2. ( $\text{Na}^+$ ) in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Er treden *geen significante verschillen* op tussen de ( $\text{Na}^+$ ) in plasma en oedeemvocht. Hoewel de ( $\text{Na}^+$ ) van oedeemvocht in de witte en de grijze stof geen enkele keer hoger is dan de ( $\text{Na}^+$ ) in plasma moet daar geen grote betekenis aan worden toegekend.

#### 4.2.3 kalium controle serie

##### Plasma

Van iedere kat werd op verschillende tijdstippen van arteriële bloedmonsters 50 ul gebruikt voor het bepalen van de ( $K^+$ ).

Tabel 7 geeft een samenvatting van de waarnemingen.

Tabel 7. Kaliumconcentratie in plasma, uitgedrukt in mM

tijd	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
$\bar{x}$	4,29	4,08	4,16	4,37	4,28	4,26
SD	0,73	0,70	0,72	0,62	0,59	0,61
N	30	30	30	30	30	30
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde waarden ( $\bar{x}$ ) met steekproefstandaarddeviaties (SD) op verschillende tijdstippen, gemeten bij dertig katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er niet-significante (NS) verschillen gevonden tussen de opeenvolgende tijdstippen (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is *geen verandering* van de ( $K^+$ ) aangetoond tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Met behulp van de toets van Friedman kan er wel een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de ( $K^+$ )<sup>plasma</sup> worden aangetoond, wat blijkt uit de toetsingsgrootheid  $C = 32,6$ . Volgens de tabellen van de chi-kwadraatverdeling is  $C_{5;0,01} = 15,1$ .

##### Oedeemvocht

Op de monsters van oedeemvocht werd dezelfde procedure (afname slangetjes en de berekening) toegepast, als in 4.2.1 met dien verstande dat thans de ( $K^+$ ) van oedeemvocht wordt bepaald. In tabel 8 zijn de  $\sum U_i$  en K voor negen naaldjes samengevat.

Tabel 8.  $\sum U_i$  en K voor de kaliumconcentratie in oedeemvocht van naaldjes in de witte en de grijze stof.

	witte stof							grijze stof		
diepte (mm)	4	5	8	9	10	11	12	6	7	13
$\sum U_i$	-	- 5,14	- 8,88	-10,52	-11,26	-14,09	-14,65	-8,13	-2,87	-4,14
K	-	- 2,57	- 3,62	- 4,29	- 4,25	- 4,70	- 4,44	-3,32	-1,66	-2,07

$\sum U_i$  en K zijn toetsingsgrootheden. Voor de berekening en de betekenis ervan zijn <sup>i</sup>verwezen naar 3.3.7.d

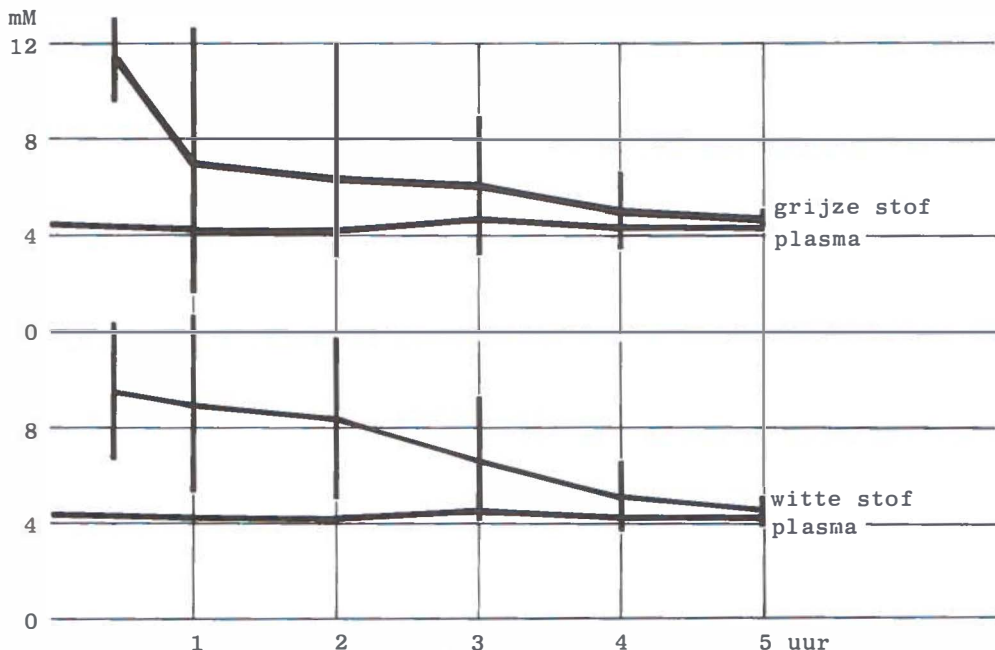
Zowel in de witte als in de grijze stof is er een *significante daling resp. stijging* in het verloop van de  $(K^+)$  oedeemvocht gevonden. Slechts voor naaldje 7 mm kan geen verandering worden aangetoond ( $K = -1,66$ ).

Tabel 9. Kaliumconcentratie in oedeemvocht (mM), geïsoleerd uit de grijze en de witte stof.

	tijd (min)	30	60	120	180	240	300
grijze stof	$\bar{x}$	11,33	7,22	6,36	6,14	4,92	4,50
	SD	1,61	5,59	2,91	2,81	1,20	0,21
witte stof	$\bar{x}$	9,52	9,10	8,59	6,74	5,22	4,93
	SD	2,62	3,43	3,33	2,70	1,13	0,94
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde en SD voor de kaliumconcentratie, uitgedrukt in mM, respectievelijk voor naalden in de grijze en de witte stof. NS geeft aan, dat er nimmer significantie kon worden verkregen bij toepassing van de Wilconxon twee steekproeven toets (tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ )

De  $(K^+)$  oedeemvocht van zowel de witte als de grijze stof daalt continu van resp. 9,52 en 11,33 mM naar resp. 4,93 en 4,50 mM gedurende het experiment. Om een indruk te krijgen hoe de kaliumconcentratie in oedeemvocht en plasma verloopt zijn de waarden van tabel 7 en 9 uitgezet in grafiek 3.



Grafiek 3.  $(K^+)$  in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Na een aanvankelijk hoge beginconcentratie daalt de kaliumconcentratie in zowel witte als grijze stof en benadert ze aan het einde van het experiment de  $(K^+)_{\text{plasma}}$ .

#### 4.2.4 $^{99m}\text{Tc}$ -albumine controle serie

Albumine kan onder normale omstandigheden niet vanuit de bloedbaan in het hersenweefsel doordringen. Wanneer echter een focale laesie wordt aangebracht aan hersenweefsel, dan zullen er uit de beschadigde vaten in het gelaedeerde gebied plasma-eiwitten uittreden en zich verspreiden in de ECS. Intraveneus toegediende  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine zal op het moment van uittreden uit de vaten op tijdstip  $t = 0$  uur (dit is het moment van toebrengen van de koude laesie) een activiteit bezitten, die gelijk is aan de activiteit in het arteriële bloedmonster. Omdat bij de verschillende proefdieren grote verschillen in activiteit op tijdstip  $t = 0$  uur zijn gevonden, is de beginactiviteit bij alle katten gelijk gesteld aan 100%. De toef of afname in activiteit in plasma of oedeemvocht zal worden berekend aan de hand van deze beginwaarde, teneinde een onderlinge vergelijking van deze resultaten der proefdieren mogelijk te maken.

#### Plasma

Van ieder kat werd op verschillende tijdstippen van arteriële bloedmonsters 0,1 ml gebruikt voor het bepalen van de  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit. Ieder monster werd gedurende 1,0 minuut geteld in de gamma-wisselaar. De korte duur van het tellen maakt een correctie voor het radio-actieve verval overbodig.

Tabel 10.  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit in plasma

tijd	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
$\bar{x}$	100(4146)	63,1(2605)	49,6(2081)	41,0(1699)	36,3(1505)	33,4(1385)
SD	(1475)	4,1	3,7	3,4	3,2	2,9
N	9	9	9	9	9	9
		(S)	(S)	(S)	(S)	(S)

Gemiddelde waarden ( $\bar{x}$ ), uitgedrukt in procenten van de blanco plasma-waarden ( $= 0$  uur). De waarden tussen haakjes geven de gemiddelde activiteit weer van negen katten, uitgedrukt in counts per minuut. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn significante (S) verschillen gevonden tussen opeenvolgende tijdstippen (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er treedt een *daling* op van de radio-activiteit in plasma tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Tevens bestaat er een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de radio-activiteit bij verschillende katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 35$ ;  $C_{5;0,01} = 15,1$ ).

### *Oedeemvocht*

Voor de procedure van de isolering van vloeistofmonsters en de berekening, die erop is uitgevoerd, zij verwezen naar 4.2.1. De capillairen, gevuld met oedeemvocht en goed afgesloten met roestvrij stalen pennetjes, werden opgerold tot kleine bolletjes van ongeveer 1 cm doorsnede, die gemakkelijk onder in een reageerbuis konden worden geteld in een gamma-wisselaar. De capillairen konden na deze metingen gebruikt worden voor de andere bepalingen (COP, elektrolyten, enzymen).

In tabel 11 zijn de  $\Sigma U_i$  en K van alle naaldjes samengevat. Voor de naaldjes in de grijze stof zijn deze opgesplitst in de waarden vóór en ná twee uur volgende op het toebrengen van de koude laesie. Dit houdt verband met het stijgend en dalend verloop in de activiteit (zie grafiek 4).

Tabel 11.  $\Sigma U_i$  en K voor de  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit van de naaldjes in de witte en de grijze stof

witte stof							
diepte (mm)	4	5	8	9	10	11	12
$\Sigma U_i$	-8,98	-8,57	-6,99	-8,57	-10,14	-8,16	-8,10
K	-4,49	-4,29	-3,50	-4,29	-4,53	-4,08	-4,05
grijze stof							
diepte (mm)	6		7		13		
tijd (min)	0 - 120	120 - 300	0 - 120	120 - 300	0 - 120	120 - 300	
$\Sigma U_i$	4,00	-5,14	3,57	-4,57	3,57	-5,14	
K	2,00	-2,57	2,06	-2,29	2,06	-2,57	

$\Sigma U_i$  en K zijn toetsingsgrootheden. Voor de berekening en de betekenissen ervan zij verwezen naar 3.3.7.d. Inzake de grijze stof is een onderscheid gemaakt voor de waarden van vóór en ná de  $t = 120$  minuten na toebrengen van de koude laesie.

Alle naaldjes in de witte stof vertonen een *verandering* in het verloop van de radio-activiteit, getuige het teken en de waarden van de toetsingsgrootheid K. Inzake de grijze stof bestaat er een *significante stijging en daling* na een maximum op  $t = 120$  min.



In tabel 12 is een samenvatting gegeven van de gemiddelde activiteit van alle monsters van resp. witte en grijze stof, geïsoleerd op zes opeenvolgende tijdstippen.

Tabel 12.  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit in oedeemvocht, geïsoleerd uit de grijze en de witte stof

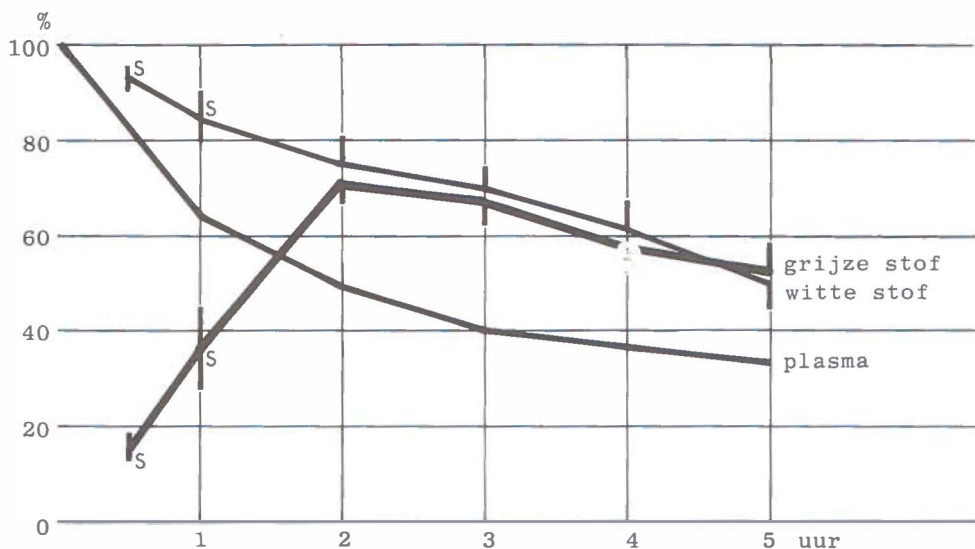
	tijd (min)	30	60	120	180	240	300
grijze stof	$\bar{x}$	14,7	36,4	71,6	66,3	57,8	52,0
	SD	3,1	8,1	4,8	4,1	3,5	4,9
witte stof	$\bar{x}$	92,8	82,8	74,5	67,0	60,5	51,5
	SD	2,8	3,5	5,0	4,2	4,8	5,4
		(S)	(S)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde en SD voor  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit, uitgedrukt in procenten van de blanco plasmawaarden (= 0 uur) voor de grijze en de witte stof. NS en S geeft aan, dat er significant resp. niet-significant verschil is gevonden bij de toepassing van de Wilcoxon twee steekproeven toets (tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ )

Gedurende het eerste uur van het experiment is er een *significant verschil* gevonden tussen de radio-activiteit in oedeemvocht van de witte en de grijze stof, zoals blijkt uit de resultaten van tabel 12.

De gegevens van de tabellen 10 en 12 zijn voor de overzichtelijkheid uitgezet in grafiek 4.

Grafiek 4 biedt ons de mogelijkheid om het activiteitsverloop van  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine te vergelijken met het verloop van de COP (zie grafiek 1). De COP is een maat voor het eiwitgehalte, waarvan albumine de grootste fractie vormt (tabel X). De radio-activiteit is een maat voor de albumineconcentratie. Er zal een relatie moeten bestaan tussen het radio-activiteitsverloop en de verandering van het eiwitgehalte in het oedeemvocht. De grafieken 1 en 4 tonen een zekere mate van overeenkomst voor zowel de witte als de grijze stof. In de discussie zal hierop nader worden ingegaan.



Grafiek 4. <sup>99m</sup>Tc-albumine-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

#### 4.2.5 lactaatdehydrogenase controle serie

##### *Plasma*

Van iedere kat werd op verschillende tijdstippen van arteriële bloedmonsters 0,1 ml gebruikt voor het bepalen van de LDH-activiteit.

Tabel 13 geeft een samenvatting van deze waarnemingen.

Tabel 13. LDH activiteit in plasma, uitgedrukt in U/l

tijd	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
$\bar{x}$	265,3	281,3	280,4	292,5	290,9	273,5
SD	69,6	60,7	68,3	80,4	90,0	89,2
N	28	28	28	28	28	28
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde waarden ( $\bar{x}$ ) met steekproefstandaarddeviaties (SD) op verschillende tijdstippen, gemeten bij 28 katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn slechts niet-significante (NS) verschillen gevonden tussen de opeenvolgende tijdstippen (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er kan *geen verandering* worden aangetoond in de LDH-activiteit van plasma tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (symmetrie toets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Ook lijkt er *geen overeenstemming* te bestaan tussen het verloop van de LDH-activiteit bij verschillende katten (toets van Friedman met  $C_{\text{plasma}} = 3,02$ ; volgens de tabellen van de chi-kwadraatverdeling is  $C_{5,0,01} = 15,1$ ).

Tevens is de relatieve iso-enzymverdeling van LDH bepaald in de arteriële bloedmonsters van 16 katten op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur.

Tabel 14 geeft een samenvatting van deze waarnemingen.

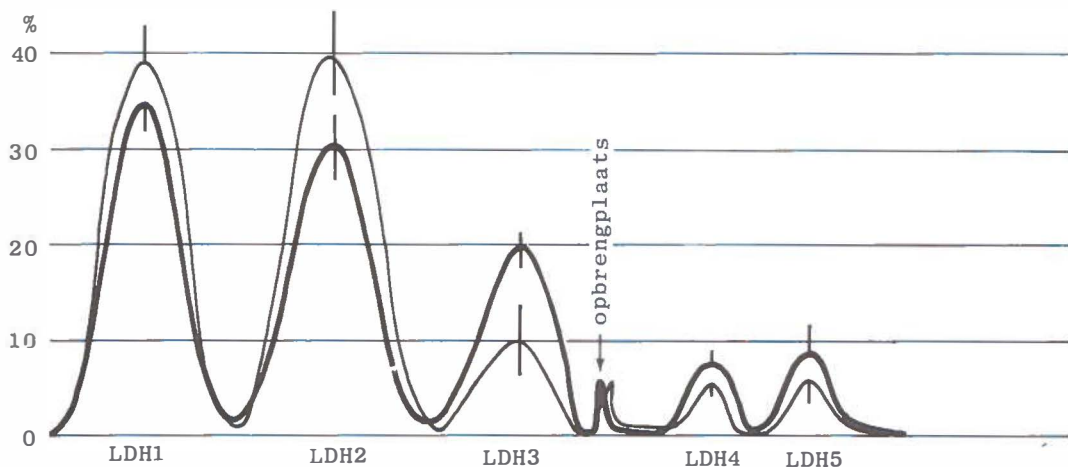
Tabel 14. Relatieve verdeling van de LDH-isoenzymen, uitgedrukt in procenten.

		LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>
$t = 0$ uur	$\bar{x}$	34,7	30,2	19,4	7,2	8,8
	SD	2,6	3,3	1,6	1,2	2,7
$t = 5$ uur	$\bar{x}$	38,4	39,4	10,2	5,9	6,1
	SD	3,8	4,2	3,5	1,0	1,8
		(S)	(S)	(S)	(S)	(S)

Gemiddelde en SD voor de LDH<sub>iso</sub>-activiteit op de  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, gemeten bij 16 katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er significante (S) verschillen gevonden tussen de paren waarden op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is een *sterke verhoging* van de LDH<sub>1</sub> en LDH<sub>2</sub>, een *sterke daling* van de LDH<sub>3</sub> en een *iets minder sterke daling* van de LDH<sub>4</sub> en LDH<sub>5</sub> in de relatieve verdeling. Alle verschillen zijn *significiant aangetoond*.

Uit bovenstaande resultaten blijkt, dat tijdens de 5 uur durende proeven alleen aan de iso-enzymverdeling van LDH in plasma een verandering kan worden aangetoond, waarvan de oorzaak gezocht moet worden in de toegediende koude laesie. Welke waarde men aan deze verandering kan hechten zal in de discussie nader worden besproken.



Grafiek 5. LDH iso-enzymverdeling in plasma op  $t = 0$  uur (dikke lijn) en  $t = 5$  uur (dunne lijn). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

### Oedeemvocht

Op monsters van oedeemvocht werd dezelfde procedure (isolatie en berekeningen) toegepast als in 4.2.1. Omdat uit het getallenmateriaal bleek, dat er voor alle oedeemvocht-monsters van de grijze stof een stijgend en dalend verloop in de activiteit was met een maximum op  $t = 1$  uur, werd de toetsingsgrootheid  $K$  berekend voor de perioden  $0 - 60$  minuten en voor  $60 - 300$  minuten.

In tabel 15 zijn de waarnemingen van acht naaldjes samengevat.

Tabel 15.  $\sum U_i$  en  $K$  voor de LDH-activiteit in oedeemvocht van de naaldjes in de witte en de grijze stof.

		witte stof					
diepte(mm)	4	5	8	9	10	11	12
$\sum U_i$	-	-6,84	-5,92	-5,14	-5,06	-6,96	-7,69
$K$	-	-3,42	-3,42	-2,57	-2,92	-3,48	-4,44
		grijze stof					
diepte (mm)	6		7			13	
tijd (min)	0 - 60	60 - 300	0 - 60	60 - 300			
$\sum U_i$	9,84	-6,03	4,12	-3,97		-	
$K$	4,92	-3,48	2,06	-2,29		-	

$\sum U_i$  en  $K$  zijn toetsgrootheden. Voor de berekening en de betekenis ervan zij verwezen naar 3.3.7.d. Inzake de grijze stof is er een onderscheid gemaakt voor de waarden van vóór en ná  $t = 60$  minuten na toebrengen van de koude laesie.

Er is een *daling* in het verloop van de LDH-activiteit in oedeemvocht van de witte stof gevonden gedurende het gehele experiment. De grijze stof vertoont zowel een *stijging* als een *daling* gedurende de periode vóór resp. ná  $t = 60$  min, getuige de waarden en het teken van de toetsingsgrootheid K.

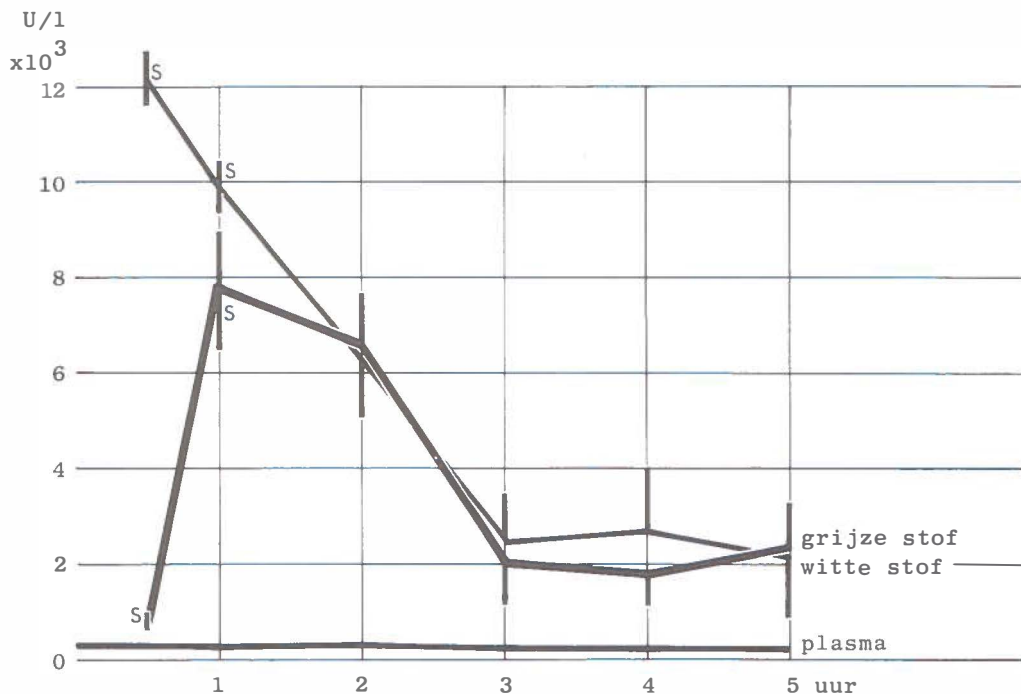
Tabel 16. LDH-activiteit in oedeemvocht, geïsoleerd uit de grijze en de witte stof.

	tijd	30	60	120	180	240	300
witte	$\bar{x}$	12110	9728	6265	2407	2016	2116
stof	SD	549	666	1272	1082	1251	1418
grijze	$\bar{x}$	759	7794	6574	2036	1867	2319
stof	SD	101	1274	992	874	647	943
		(S)	(S)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde en SD voor de LDH-activiteit, uitgedrukt in U/l, resp. voor naaldjes in de grijze en de witte stof. (NS) en (S) geven aan, dat er niet-significantie resp. significantie is gevonden bij de toepassing van de Wilcoxon twee steekproeventoets (tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is een *significant verschil* gevonden tussen de LDH-activiteit in oedeemvocht van zowel witte als grijze stof gedurende het eerste uur van het experiment, zoals blijkt uit de resultaten van tabel 16. Uit deze resultaten blijkt duidelijk het verloop in activiteit, zoals deze in tabel 15 naar voren is gekomen.

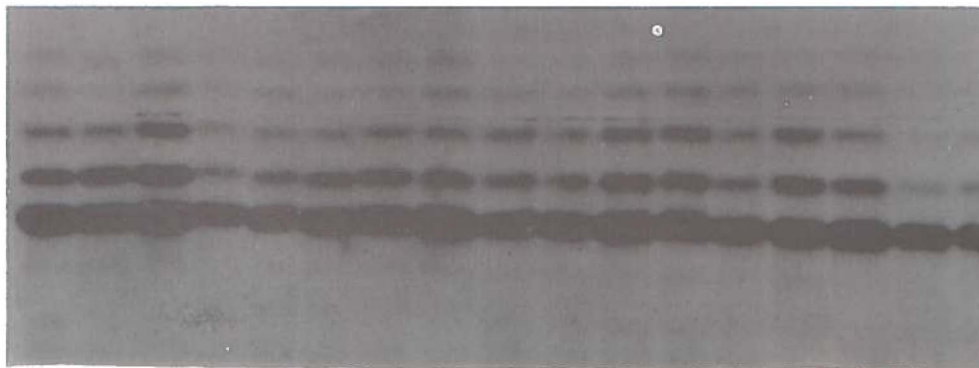
Om de activiteitsveranderingen in oedeemvocht onderling te vergelijken en ook ten opzichte van de plasmawaarden zijn de waarden van de tabellen 14 en 16 uitgezet in grafiek 6.



Grafiek 6. LDH-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

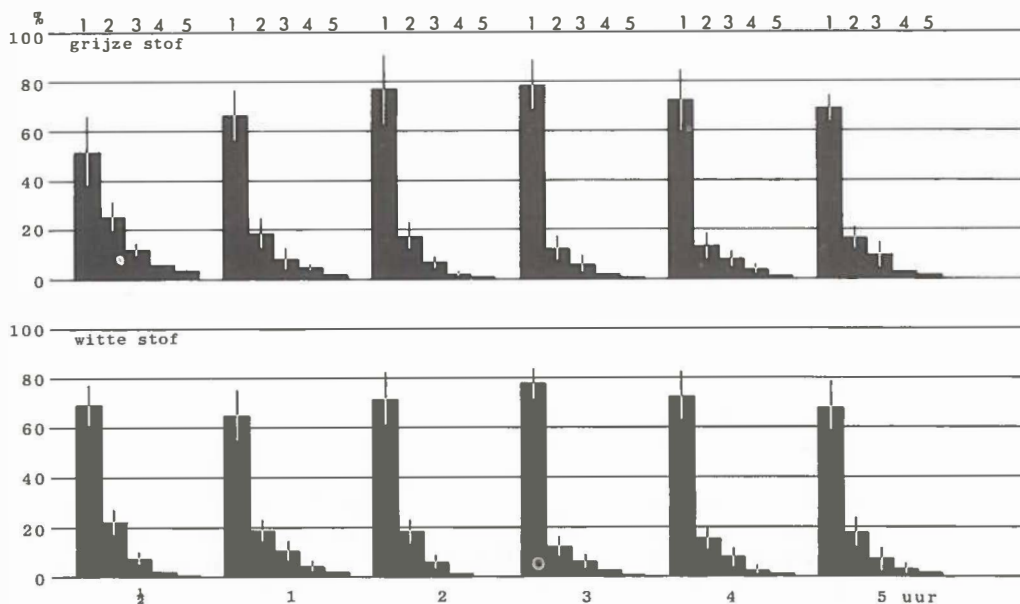
De LDH-activiteit in oedeemvocht toont zeer sterke veranderingen gedurende het experiment. Drie uur na de koude laesie treedt een stabilisatie op, waarbij de activiteit van LDH in oedeemvocht rondom de 2000 U/l schommelt. Ook hier valt weer het verschil op tussen de waarden van de witte en grijze stof in het begin van het experiment, zoals deze zijn aangetoond bij de COP- en  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteitsmetingen. Van het oedeemvocht werd op zes opeenvolgende tijdstippen de relatieve iso-enzymverdeling van de LDH bepaald.

Figuur 17 Foto van elektroforeseplaat van de LDH<sub>iso</sub>-bepaling. De meest donkere bandjes zijn de LDH<sub>1</sub> iso-enzymen van een serie oedeemvloeistofmonsters



De iso-enzymverdeling kan worden berekend door het scannen van de elektroforeseplaten.

Grafiek 7 geeft een samenvatting van deze waarnemingen.



Grafiek 7. Relatieve verdeling van de vijf LDH-iso-enzymen in oedeemvocht, geïsoleerd uit grijze en witte stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

De resultaten voor de witte stof zijn als volgt samen te vatten: er is een *stijging* en een *daling* gevonden voor LDH<sub>1</sub> resp. LDH<sub>2</sub> met een maximum resp. minimum op  $t = 180$  min. De kortstondige *stijging* van de overige iso-enzymen vertoont een maximum op  $t = 60$  min (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

De resultaten van de grijze stof zijn als volgt samen te vatten: het oedeemvocht vertoont een *stijging* voor de LDH<sub>1</sub> t/m LDH<sub>4</sub> en een *daling* voor LDH<sub>5</sub> met een maximum resp. minimum op  $t = 180$  min (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.2.6 creatine-fosfokinase controle serie

##### *Plasma*

Van iedere kat werd op verschillende tijdstippen van arteriële bloedmonsters 0,1 ml gebruikt voor het bepalen van de CPK-activiteit.

Tabel 17 geeft een samenvatting van deze waarnemingen.

Tabel 17. CPK-activiteit in plasma uitgedrukt in U/l.

tijd	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
$\bar{x}$	372,1	342,6	336,3	309,6	320,4	328,6
SD	38,1	36,0	46,7	27,6	30,5	45,4
N	9	9	9	9	9	9
	(S)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	

Gemiddelde waarden ( $\bar{x}$ ) met steekproefstandaardeviaties (SD) op verschillende tijdstippen, gemeten bij 9 katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn significante (S) en niet-significante (NS) verschillen gevonden tussen opeenvolgende tijdstippen (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is een *daling* gevonden in de CPK-activiteit tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Tevens is er een *zekere overeenstemming* aangetoond tussen het verloop van de CPK-activiteit van verschillende katten (toets van Friedman met  $C_{\text{plasma}} = 16,31$ ; volgens tabellen van de chi-kwadraatverdeling is  $C_{5;0,01}^{\text{plasma}} = 15,1$ ). De hoge beginwaarden in de CPK-activiteit bij alle proefdieren is waarschijnlijk het gevolg van de getraumatiseerde spieren (verhoging van de CPK<sub>MM</sub>). Omdat onze belangstelling uitgaat naar het hersenspecifieke iso-enzym CPK<sub>BB</sub> zijn de iso-enzymen in de plasmamonsters elektroforetisch gescheiden. Onder een UV-lamp (365 nm) worden de iso-enzym-activiteiten visueel beoordeeld. Wat men met de fluorescentiemethode meet is de hoeveelheid gevormde NADPH. De waarnemingen zijn samengevat in tabel 18.

Tabel 18. CPK iso-enzymverdeling in plasma.

	0 uur	1 uur	2 uur	3 uur	4 uur	5 uur
MM	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MB	-	-	-	-	-	-
BB	-	+	+	+	++	++

Visuele beoordeling onder de UV-lamp van de iso-enzymverdeling in plasmamonsters van vóór en ná een toegebrachte koude laesie:

+++ = zeer sterk; ++ = sterk; + = normaal; + = zwak; - = afwezig.

Het hersenspecifieke iso-enzym *verschijnt in het plasma* 3 uur na toebrengen van de koude laesie. Gedurende de eerste twee uren zijn zwakke bandjes in het BB-gebied op de elektroforeseplaten te onderscheiden, die wij niet als specifiek kunnen beschouwen. Daarna neemt de intensiteit snel toe. Op dit ver-



schijnsel zal in de discussie worden ingegaan. In tegenstelling tot de totale CPK-activiteit geeft de iso-enzymverdeling aantoonbare veranderingen na toebrengen van een koude laesie.

### *Oedeemvocht*

Op monsters van oedeemvocht werd dezelfde procedure toegepast als in 4.2.1. In tabel 19 zijn de waarnemingen van acht naaldjes samengevat.

Tabel 19.  $\Sigma U_i$  en K voor de CPK-activiteit in oedeemvocht van de naaldjes in de witte en de grijze stof.

witte stof							
diepte	4	5	8	9	10	11	12
(mm)							
$\Sigma U_i$	-	-4,00	-5,06	-7,69	-	-5,14	-6,57
K	-	-2,00	-2,92	-3,14	-	-2,57	-2,94
grijze stof							
diepte	6		7		13		
(mm)							
tijd (min)	0 - 60	60 - 300	0 - 60	60 - 300	0 - 60	60 - 300	
$\Sigma U_i$	2,14	-5,13	3,92	-7,92	6,35	-5,75	
K	2,7	-2,57	1,96	-3,54	2,84	-2,57	

$\Sigma U_i$  en K zijn toetsingsgrootheden. Voor de berekening en de betekenis ervan zij verwezen naar 3.3.7.d. Inzake de grijze stof is er een onderscheid gemaakt voor de waarden van vóór en ná  $t = 60$  min na het toebrengen van de koude laesie

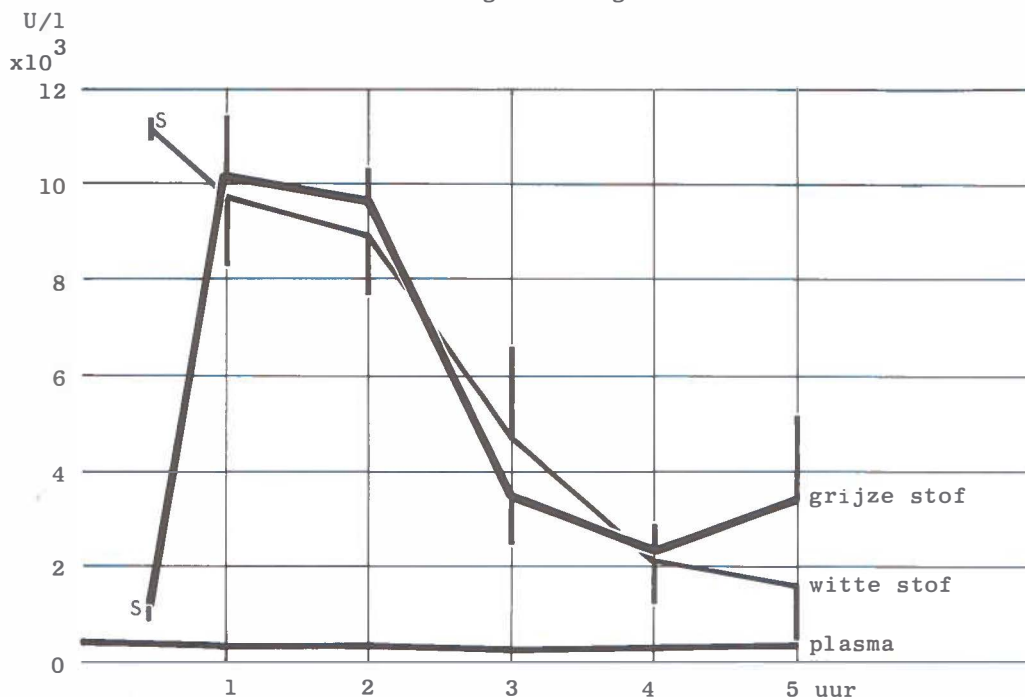
De *daling* van de CPK-activiteit in oedeemvocht van zowel de witte als de grijze stof is *significant* aantoonbaar gedurende het gehele experiment. De grijze stof toont *zowel een stijging als een daling* in de activiteit van de CPK gedurende de periode vóór resp. ná  $t = 60$  min. Dit blijkt uit de waarden en het teken van de toetsingsgrootheid K. Hetzelfde patroon in activiteitsverloop is waargenomen bij de LDH-bepalingen (tabel 15). Om een indruk te krijgen van de mate van verandering is een samenvatting gemaakt van de gemiddelde activiteit in oedeemvocht van witte en grijze stof op zes opeenvolgende tijdstippen en is weergegeven in tabel 20.

Tabel 20. CPK-activiteit in oedeemvocht, geïsoleerd uit de grijze en de witte stof

	tijd	30	60	120	180	240	300
grijze stof	$\bar{x}$	1064	9994	9614	3475	2270	3410
	SD	98	1386	677	842	468	1744
witte stof	$\bar{x}$	11018	9790	8946	4783	2201	1660
	SD	203	1411	1213	1847	934	1196
		(S)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Gemiddelde en SD voor de CPK-activiteit, uitgedrukt in U/l, resp. voor naaldjes in de grijze en de witte stof. (NS) en (S) geeft aan, dat er niet-significant resp. significant verschil is gevonden bij de toepassing van de Wilcoxon twee steekproeven toets (tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ )

Alleen op  $t = 30$  min is een *significant verschil* gevonden tussen de activiteiten in oedeemvocht van witte en grijze stof. Om het activiteitsverloop van CPK in plasma, witte stof en grijze stof onderling te kunnen vergelijken zijn de waarden uit de tabellen 18 en 20 uitgezet in grafiek 8.



Grafiek 8. CPK-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

De CPK-activiteit toont zeer sterke veranderingen gedurende het experiment; aan het einde van het experiment treedt enige stabilisatie in de activiteit op. Evenals bij  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine en LDH treedt na een aanvankelijke activiteitsstijging in de monsters uit de grijze stof een daling in na  $t = 60$  min. Om een indruk te krijgen van de oorsprong van de CPK werden monsters electroforetisch gescheiden, gevolgd door een kleur-reactie. Uit deze proeven blijkt, dat CPK<sub>BB</sub> het belangrijkste iso-enzym is, namelijk 96% (SD = 4,2) van de totale enzymactiviteit. Het CPK<sub>MM</sub> neemt aan de totaal activiteit voor slechts 4% (SD = 2,9) deel. De uitslagen van deze proef zijn derhalve niet getabelleerd, zoals dat is gebeurd voor de LDH<sub>iso</sub>.

#### 4.2.7 liquor controle serie

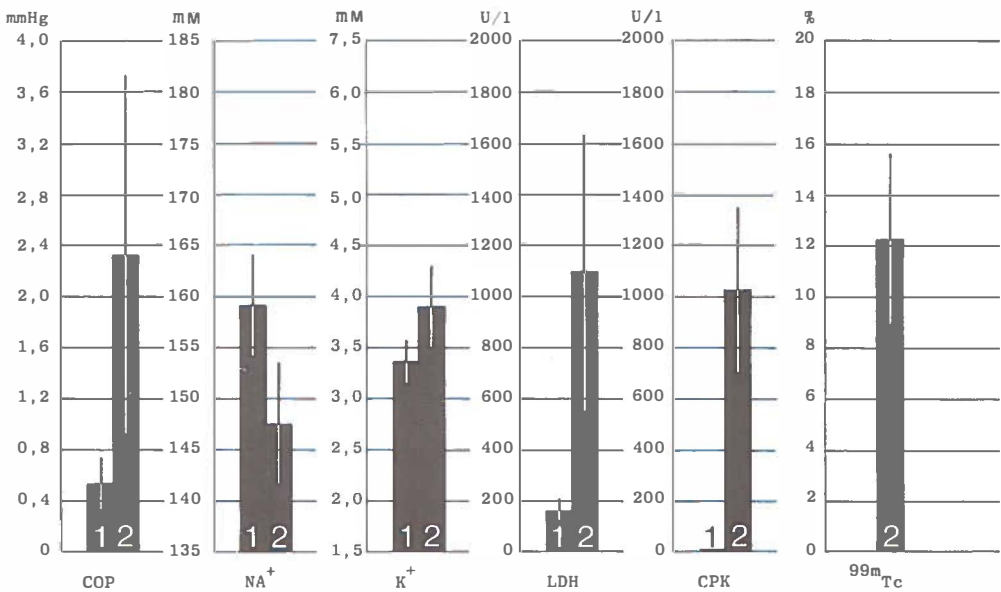
Aangenomen wordt, dat de samenstelling van de ECF identiek dan wel nagenoeg identiek is aan de samenstelling van de CSF. Als gevolg van de bulk flow van het oedeemvocht mag worden verwacht, dat componenten van deze vloeistof in de ventrikel-ruimte terecht kunnen komen. Uit het onderzoek van Maas(1977) blijkt dat de activiteit van bepaalde enzymen binnen twee uur na het toebrengen van een koude laesie bij katten in verhoogde mate in de CSF aantoonbaar zijn. In ons onderzoek is alleen de CSF van katten zonder koude laesie (blanco) vergeleken met de CSF van proefdieren, die 5 uur na het toebrengen van een koude laesie was afgenomen(tabel 21). Het bleek om nog onduidelijke redenen niet mogelijk een goede iso-enzymtypering van LDH en CPK in liquor te verkrijgen. Uit de zeer slechte zymogrammen kon wel worden opgemaakt, dat de iso-enzymverdeling voor zowel blanco als controle serie overeenkomsten vertoonde met de resultaten van Maas (1977) namelijk een hoge LDH<sub>1</sub> en een lage LDH<sub>5</sub> (zie ook tabel XV).

Tabel 21. Samenstelling van CSF vóór en ná toebrengen van een koude laesie

natrium	(mM)	159,2	±	5,1	147,8	±	6,0	(S)
kalium	(mM)	3,34	±	0,22	3,87	±	0,40	(S)
COP	(mmHg)	0,55	±	0,20	2,36	±	1,42	(S)
LDH	(U/L)	152,6	±	35,4	1090	±	543	(S)
CPK	(U/L)	6,64	±	2,15	1019	±	310	(S)
$^{99m}\text{Tc}$ -albumine		0			12,1	±	2,4 <sup>*</sup>	

Gemiddelde waarden van liquorcomponenten ± SD. Met behulp van de Wilcoxon twee steekproeven-toets zijn er significante (S) verschillen gevonden tussen de blanco- en controleserie (significantieniveau  $\alpha = 0,001$ ). De  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit is uitgedrukt in procenten van de plasma-activiteit op  $t = 5$  uur (\* : N = 6)

Er blijken vijf uur na het toebrengen van de koude laesie *grote significante verschillen voor alle zes parameters* op te treden. De waarden uit tabel 21 zijn in grafiek 9 weergegeven.



Grafiek 9. Gemiddelde waarden van zes liquorcomponenten van een serie katten zonder koude laesie en een serie katten met een koude laesie. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan. De waarden zijn ontleend aan tabel 21.

#### 4.2.8 conclusie en discussie controle serie

De isolering van het oedeemvocht biedt de mogelijkheid de veranderingen in de ECF en de ECS te bestuderen tijdens een experimenteel opgewekt vasogeen hersenoedeem. Bij de beschouwing van de analyse van oedeemvocht zou de samenstelling van normaal ECF betrokken moeten worden. Het is echter niet mogelijk gebleken normaal ECF te isoleren met behulp van onze techniek. De samenstelling van normaal ECF komt nagenoeg overeen met die van de CSF ten gevolge van de zeer gemakkelijke uitwisseling van stoffen tussen het liquor- en hesencompartiment. Het is daarom acceptabel de samenstelling van het oedeemvocht te vergelijken met die van de CSF.

De (Na<sup>+</sup>)<sub>oedeemvocht</sub> (141 - 143 mM) vertoont grotere overeenkomst met de natriumconcentratie in plasma dan die van normaal CSF (159,2 ± 5,1 mM). Dit is in overeenstemming met de verwachte vasogene oorsprong van het oedeemvocht. Aan het einde van het experiment neemt de concentratie van natrium in de CSF toe, hetgeen wijst op een belangrijke bijdrage van het oedeem-

vocht tot de CSF-samenstelling onder deze omstandigheden (147,8 + 6,0 mM).

De hoge beginwaarden voor  $(K^+)$  oedeemvocht (9,52 - 11,53 mM) kunnen worden verklaard door de cellulaire beschadiging ten gevolge van de koude laesie. De kaliumconcentratie daalt na de onmiddellijke hoge beginwaarden en benadert aan het einde van het experiment de  $(K^+)$  plasma. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de uitbreiding van het oedeemvocht en de opname door gliacellen. Er bestaat een hypothese, die zegt dat gliacellen een bufferfunctie vervullen. Wanneer de kaliumconcentratie in de ECF sterk oploopt, dan zullen de gliacellen kaliumionen opnemen en mogelijk afgeven bij een sterke daling van de  $(K^+)$  (Somjen 1976). Evenals bij natrium wordt een verhoogd kalium<sup>ecf</sup>-gehalte in de CSF gemeten aan het einde van het experiment (3,87 + 0,40 mM).

De voor enzymen gevonden waarden bevestigen de celbeschadiging. Opvallend is de onmiddellijke stijging in het oedeemvocht van de witte stof (12110 en 11018 U/l voor resp. LDH en CPK). In de grijze stof lijkt het oedeem zich langzamer uit te breiden, zoals uit de pas na enige tijd optredende stijging van de activiteit blijkt. Later nemen de enzymenactiviteit in het oedeemvocht van zowel witte als grijze stof af. Dit is waarschijnlijk het resultaat van verdunning tijdens de uitbreiding van het exsudaat vanaf het gelaedeerde gebied naar de gehele hemisfeer. Er treedt gedurende de laatste 1 - 2 uur van het experiment een stabilisatie op in de enzymenactiviteit. Ook in de liquor wordt aan het einde van de experimenten een sterk verhoogde enzymenactiviteit gevonden (van 152,6 naar 1090 U/l en van 6,64 naar 1019 U/l voor resp. LDH en CPK). Deze verhoogde activiteit in de CSF na het toebrengen van een koude laesie bij katten is reeds gevonden door Maas (1977). In plasma kan geen verandering van de enzymenactiviteit worden aangetoond gedurende het gehele experiment, die het gevolg zouden kunnen zijn van het hersenoedeem. De verhoogde CPK-activiteit gedurende het eerste uur wordt veroorzaakt door het spiertrauma van de arteriële en veneuze canules alsmede het afschuiven van de spieren van de schedel (Somer, 1977).

De LDH- en CPK-bepalingen verschaffen geen inlichtingen van waarde voor de diagnostiek bij hersenoedeem. De iso-enzymbepaling van beide enzymen geven wél informatie in onze experimenten. Drie uur na het toebrengen van de koude laesie verschijnt het hersenspecifieke CPK<sub>BB</sub> in het bloed. Er treedt een verschuiving op in de relatieve iso-enzymverdeling van LDH in plasma ten gunste van LDH<sub>1</sub> en LDH<sub>2</sub>. De voornoemde spiertraumata schijnen de verdeling niet te beïnvloeden door een verhoging van de LDH<sub>4</sub> en LDH<sub>5</sub>-iso-enzymen. Het effect van hersenoedeem kan evenwel die van de spiertraumata maskeren. De door ons gemeten veranderingen moeten derhalve het gevolg zijn van de aangebrachte laesie. Volkomen in tegenspraak met onze bevindingen heeft Maas (1977) na het aanbrengen van een koude laesie een volledig omgekeerd zymogram gevonden in het serum van de kat (identiek aan de iso-enzymverdeling van spierweef-

selextracten). Voor deze tegenstelling hebben wij geen verklaring kunnen vinden. Hoewel LDH<sub>1</sub> de predominante fractie is, is deze fractie in hersenweefsel nog groter, blijkens de waarden van het oedeemvocht. De verhoging van LDH<sub>1</sub> in plasma na koude laesie is dus een afspiegeling van dit hoge percentage dat dit iso-enzym in de hersenen uitmaakt van de totale LDH. Ook in de literatuur is bekend, dat LDH<sub>1</sub> en LDH<sub>2</sub> de belangrijkste fracties zijn in het hersenweefsel (Rabow, 1977a t/m c McCormick, 1974; Lindblom, 1967). Lindblom toont bij patiënten met traumatische hersenbeschadigingen een sterk verhoogde LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub> en LDH<sub>3</sub> activiteit in plasma aan. De LDH<sub>iso</sub> in oedeemvocht laat het volgende beeld zien. In oedeemvocht - van plasmatische oorsprong - treedt vermenging op met het vrijgekomen ICF na de cellulaire beschadiging. De iso-enzymverdeling in plasma, hersenweefsel en oedeemvocht is als volgt samen te vatten:

	LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>	Referentie
plasma	34,7	30,2	19,4	7,2	8,0	tabel 14
hersenen	52	27	12	7	2	Lindblom(1977)
mens						
hersenen	50	30	10	3	7	Maas (1977)
kat						
hersenstam	61 <sub>+9</sub>	17 <sub>+4</sub>	7 <sub>+4</sub>	4 <sub>+3</sub>	6 <sub>+4</sub>	Rabow(1977a)
konijn						
grijze stof	68,5	18,0	7,5	2,8	1,4	graf. 7(5 uur)
witte stof	69,4	16,9	9,3	3,1	1,9	graf. 7(5 uur)

In de literatuur blijken grote verschillen in relatieve verdeling te bestaan voor de verschillende delen van de hersenen. Rabow vindt het hoogste percentage LDH<sub>1</sub> in de hersenstam van het konijn. Van kattenhersen is slechts één geschatte LDH iso-enzymverdeling bekend(Maas, 1977). Uit grafiek 6 en 7 volgt dat de LDH-activiteit in oedeemvocht voornamelijk afkomstig is van de ICF. Wij mogen daarom aannemen, dat de iso-enzymverdeling, zoals wij gevonden hebben in oedeemvocht van witte en grijze stof de relatieve verdeling van de LDH in de ICF zeer dicht benadert. De CPK-iso-enzymverdeling in oedeemvocht bewijst, dat CPK hoofdzakelijk uit de beschadigde cellen afkomstig moet zijn getuige het percentage CPK<sup>BB</sup>, namelijk 96%. Terwijl de cellulaire enzymactiviteit in oedeemvocht een maat is voor de beschadiging ten gevolge van de koude laesie, is de COP (maat voor het eiwitgehalte) en <sup>99m</sup>Tc-albumine-activiteit een maat voor de BBB-beschadiging. Deze beschadiging is in ons experiment zichtbaar aan de verhoogde COP en het verschijnen van de <sup>99m</sup>Tc-albumine in het oedeemvocht. Deze verschijnselen vallen reeds in de eerste monsters op. Evenals de enzymactiviteit vertonen de radio-activiteit van het gemerkte albumine en de COP een onmiddellijke stijging in het oedeemvocht van de witte stof. Dertig minuten na het toebrengen van de koude laesie liggen de waarden van de radio-activiteit en de

COP direct onder die van plasma. In de grijze stof blijkt het oedeem zich langzamer uit te breiden getuige de meetbare stijging van de radio-activiteit en de COP in oedeemvocht gedurende de eerste periode van het experiment. Het zijn in het bijzonder de eiwitten, die worden geremd in hun bewegingen in de niet beschadigde grijze stof; dit in tegenstelling tot de elektrolyten, die deze concentratieverschillen tussen witte en grijze stof niet vertonen. De weerstand van de grijze stof moet worden toegeschreven aan de weefselstructuur, namelijk reticulair gerangschikte, hechte cellenstructuur met kronkelige extracellulaire ruimten van 150 - 200 Å. De witte stof is daarentegen opgebouwd uit parallel gerangschikte axonen met spleten van 100 - 200 Å. Deze axonen kunnen makkelijk van elkaar wijken, waardoor de spleten tot meer dan 800 - 1000 Å in doorsnede toenemen (Gonatas, 1963; Klatzo, 1967; Go, 1967). De witte stof kan dus gemakkelijk worden "opgeblazen", zodat oedeemvocht - en in het bijzonder de hoogmoleculaire stoffen - zonder veel weerstand te ondervinden de witte stof kan binnendringen. Eiwitten in oedeemvocht van vasogene oorsprong variëren in doorsnede van + 40 Å voor albumine tot + 125 Å voor bèta-lipoproteïnen. Dit werkt eveneens remmend op een goede bulk flow in de grijze stof. Ongeveer 2-3 uur na de koude laesie heeft het oedeemvocht zich homogeen verdeeld over de grijze en de witte stof, getuige dezelfde samenstelling van het oedeemvocht in de beide weefselcompartimenten. Evenals de toename van de enzymenactiviteit suggereren de verhoogde COP-waarden in de CSF-monsters een vermenging van het oedeemvocht met de liquor (stijging van 0,55 naar 2,36 mmHg). De lichte daling van de COP kan worden toegeschreven aan te grote rehydratie na het <sup>plasma</sup> afnemen van de bloedmonsters. Dit verdunningsartefact treedt op door het overvloedige doorspoelen van de arteriële en veneuze canule met een isotone zoutoplossing + heparine.

Voor een algemeen vergelijkend overzicht zij verwezen naar blz. 135: "Het onderlinge verband tussen de series I t/m IV". Daar is het verloop der verschillende parameters weergegeven van de vier series proefdieren.

## 4.3 serie II "hypoxie"

In 4.2 zijn uitgebreid de berekeningswijzen en de veranderingen van plasma, oedeemvocht en liquor besproken. Daar de uitvoering en de berekening in deze en volgende series op de meeste punten overeenkomen met de controle serie zal omwille van de eenvoud en voor een beter overzicht van de verkregen resultaten en tabellen - voor zover mogelijk - achterwege worden gelaten. De belangrijkste gegevens van de tabellen zullen in de grafieken worden verwerkt. Ter wille van de duidelijkheid van de volgende grafieken is de SD van plasma niet weergegeven. Naar deze resultaten van de controle serie kan worden verwezen voor zowel de hypoxie serie als voor de ouabaine en fysiologisch zout serie. Bij de hypoxieproeven werd het totale volume van het gasmengsel voor de beademing van het proefdier constant gehouden. De verhouding werd echter gewijzigd van  $N_2O: O_2 = 2,00 : 1,00$  liter naar  $2,85 : 0,15$  liter.

De hypoxie werd geïnduceerd op  $t = 100$  min. Bloedmonsters werden gecontroleerd op hun samenstelling.

Tabel 22. Samenstelling van het bloed vóór en tijdens hypoxie

	pH			$pCO_2$			$pO_2$			$HCO_3^-$			saturatie		
voor	7,385	+	0,10	40,2	+	4,2	157,4	+	33,2	21,7	+	3,0	98,1	+	1,7
hypoxie															
tijdens	7,105	+	0,21	17,1	+	8,2	36,8	+	12,5	11,8	+	4,0	44,2	+	9,5
hypoxie															

$pCO_2$  en  $pO_2$  zijn uitgedrukt in mmHg,  $HCO_3^-$  in mM en saturatie in percentages; + SD

De geïnduceerde hypoxie is van een matige vorm, zoals blijkt uit de daling van de arteriële zuurstofspanning en saturatie. Een ernstiger vorm van hypoxie door het verder verlagen van de zuurstoftoevoer bleek niet uitvoerbaar, omdat het proefdier onder de gelijke omstandigheden het experiment niet zou doorstaan. Door een lichte hyperventilatie van de proefdieren ontstond een hypocapnie. Toch bleef een lichte vorm van metabole acidose bestaan, waarschijnlijk als gevolg van een zuurstofgebrek in het totale lichaam van de kat.

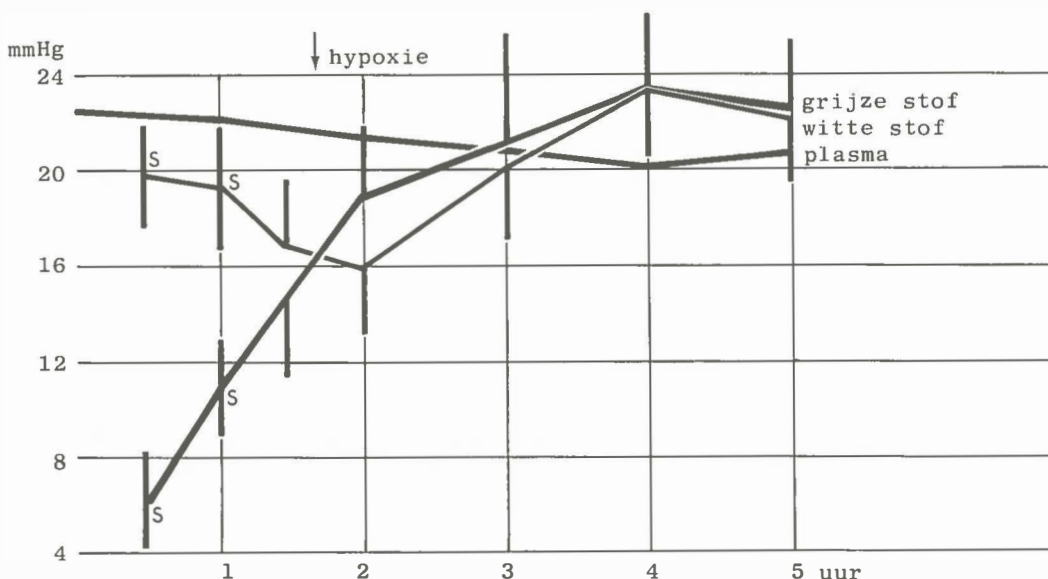
### 4.3.1 colloidosmotische druk (COP) hypoxie serie

#### *Plasma*

Er is een *daling* van de  $COP_{\text{plasma}}$  gevonden tussen de waarden van  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur; er kan evenwel *geen verandering* worden aangetoond tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Er kan *geen overeenstemming* worden aangetoond tussen het verloop van de  $COP_{\text{plasma}}$  na koude laesie bij negen katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 10,46$ ;  $C_5 = 0,01 = 15,1$ ).



Voor inductie van de hypoxie is het verloop als bij de controle serie, dat wil zeggen *stijgend* voor de grijze stof en *dalend* voor de witte stof. Bovendien treden *significante verschillen* op tussen de COP van het oedeemvocht en de witte stof. Tijdens hypoxie treedt een *stijging* op voor zowel witte als grijze stof tot  $t = 4$  uur; daarna *daalt* de COP in oedeemvocht van witte en grijze stof zonder dat dit met de toets kan worden aangetoond (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Dit resultaat geldt voor alle acht naaldjes, die vloeistof produceerden. Omdat de hypoxie werd geïnduceerd op  $t = 100$  min werd in de berekening van de toetsingsgrootte  $K$  als extra tijdstip  $t = 90$  min opgenomen. De berekening voor  $K$  werd, evenals in de controle serie, uitgevoerd over drie perioden, te weten  $0 - 100$ ,  $100 - 210$  en  $210 - 300$  min. Grafiek 10 geeft het verloop weer van de COP in plasma en oedeemvocht.



Grafiek 10. Verandering van de COP voor plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

De COP <sup>oedeemvocht</sup> stijgt boven de COP <sup>plasma</sup> uit, 80 min na inductie van de hypoxie.

De witte en grijze stof bereiken een maximum van  $23,3 \pm 2,9$  resp.  $23,3 \pm 3,5$  mmHg op  $t = 4$  uur. De plasmawaarde op dit tijdstip is  $20,1 \pm 1,9$  mmHg. Het verschil tussen oedeemvocht en plasma is alleen op  $t = 4$  uur significant aantoonbaar.

Theoretisch is het niet waarschijnlijk, dat de COP oedeemvocht boven de plasmawaarde uitkomt, omdat het vocht van vasogene oorsprong is. Dit verschijnsel kan derhalve worden toegeschreven aan de hypoxie. Bij het gelabeld albumine, kalium en de enzymen zullen wij een dergelijk effect van hypoxie waarnemen.

#### 4.3.2 natrium hypoxie serie

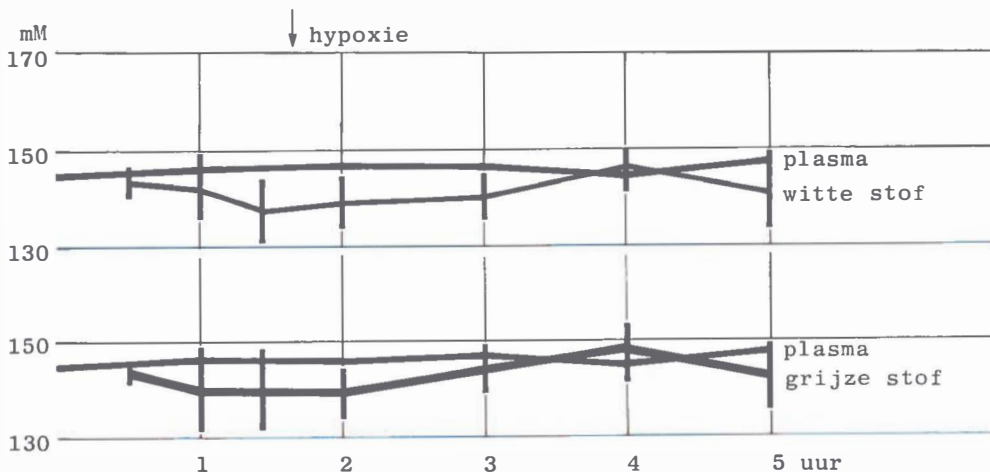
##### Plasma

Er is *geen verandering* gevonden van de  $(Na^+)_{\text{plasma}}$  tussen de waarden van  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur of tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Er kan ook *geen overeenstemming* worden aangetoond tussen het verloop van de  $(Na^+)$  bij verschillende katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 1,86$ ;  $C_5; 0,01 = 15,1$ ).

##### Oedeemvocht

Van de tien producerende naaldjes in de witte en de grijze stof vertoont *geen enkele een verandering* in verloop van de  $(Na^+)$  gedurende het gehele experiment, hetgeen blijkt uit de waarden van de toetsingsgrootheid K.

Er bestaat eveneens *geen significant verschil* tussen de waarden van de  $(Na^+)$  in oedeemvocht van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeventoets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). In grafiek 11 zijn de gemiddelde natriumconcentraties van plasma en oedeemvocht weergegeven.



Grafiek 11.  $(Na^+)$  in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Natrium is de enige parameter van oedeemvocht, die niet beïnvloed wordt door de hypoxie, zoals zal blijken uit de nu volgende resultaten in 4.3.3 t/m 4.3.6.

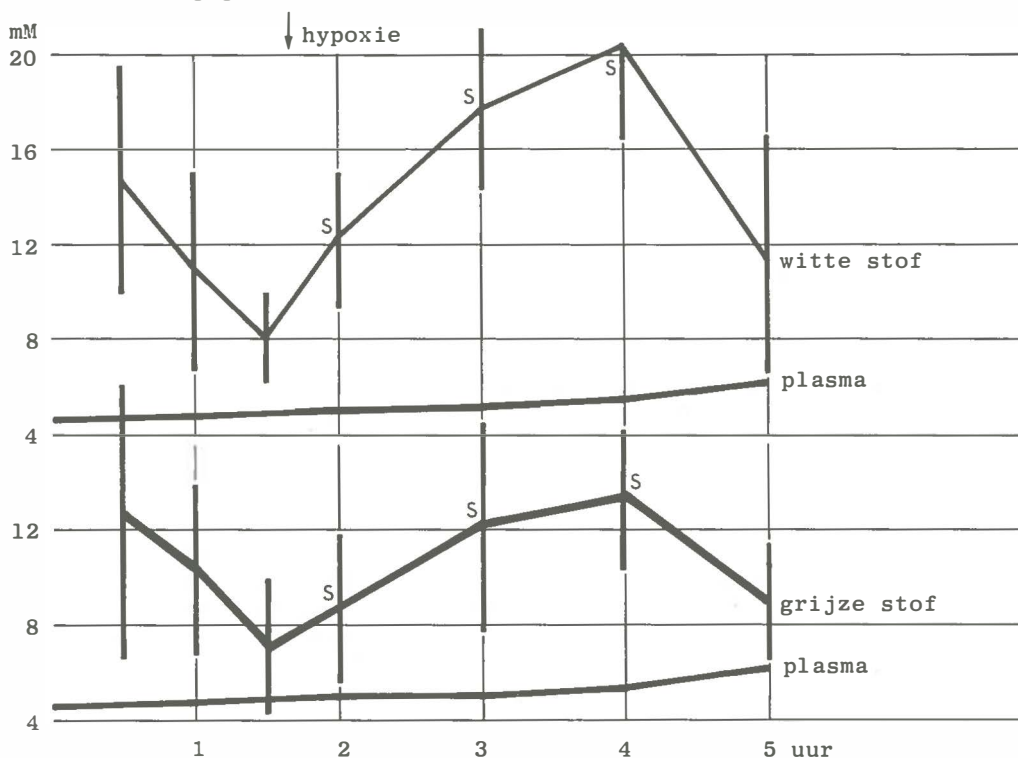
### 4.3.3 kalium hypoxie serie

#### Plasma

In het arteriële bloed van negen katten werd de ( $K^+$ )<sub>plasma</sub> bepaald. Er is een *zekere mate van overeenstemming* tussen het verloop van de ( $K^+$ ) (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 17,13$ ;  $C_5 = 15,1$ ) als ook een *stijging* over de periode  $t = 0$  t/m  $t = 5$ ;  $0,01$  uur (Wilcoxon symmetrietoets, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ) Met behulp van laatstgenoemde toets is alleen over het tijdsinterval  $t = 4$  t/m  $t = 5$  uur een *stijging* aangetoond.

#### Oedeemvocht

Een *daling* van de ( $K^+$ ) in witte en grijze stof is voor drie van de tien naaldjes volgens de toetsgrootheid K niet aangetoond gedurende de eerste periode tot  $t = 100$  min. De daaropvolgende *stijging en daling* is voor acht van de tien naaldjes significant aantoonbaar. In grafiek 12 zijn de ( $K^+$ ) van plasma en oedeemvocht weergegeven.



Grafiek 12. ( $K^+$ ) in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeventoets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Er is een stijging en een daling gevonden in het verloop van de ( $K^+$ ). Het maximum ligt op  $t = 4$  uur met waarden van  $20,1 \pm 4,7$  resp.  $13,4 \pm 3,7$  mM voor witte en grijze stof (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $= 0,05$ ). Opvallend zijn de *significante verschillen* tussen de waarden van de witte en de grijze stof op  $t = 2, 3$  en  $4$  uur ( zie grafiek 12).

#### 4.3.4 $^{99m}\text{Tc}$ -albumine hypoxie serie

##### *Plasma*

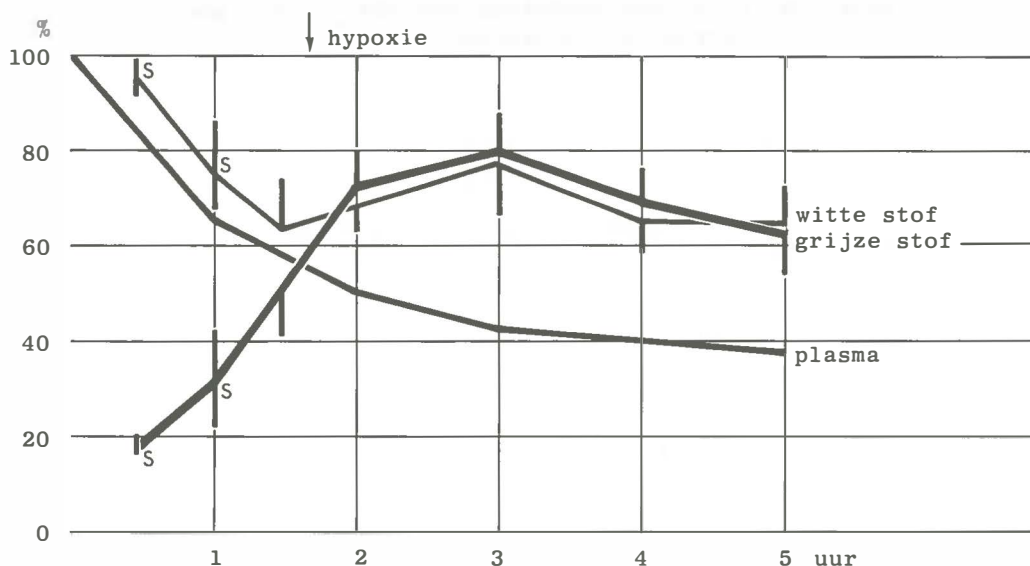
Er is een *daling* van de radio-activiteit in plasma gevonden tussen de waarden van  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, als ook tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Tevens bestaat er een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de radio-activiteit bij negen katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 30$   $C_5$ ;  $0,01 = 15,1$  (zie grafiek 12).

##### *oedeemvocht*

$^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit vertoont hetzelfde verloop als in de controle serie tot  $t = 100$  min: een *stijging* voor de grijze en een *daling* voor de witte stof (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Tevens bestaan er *significante verschillen* tussen de waarden van de witte en grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets, tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). Na inductie van de hypoxie treedt een stijging (niet-significant) op van de radio-activiteit in zowel witte als grijze stof. Na een maximum op  $t = 3$  uur kan een daling worden aangetoond voor de laatste twee uur van het experiment. Deze resultaten volgen uit de toetsingsgrootheid  $K$  van de 8 producerende naaldjes. In grafiek 13 zijn de  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteiten van plasma en oedeemvocht uitgezet.

Evenals bij de controle serie zijn de verschillen voor witte en grijze stof op  $t = 30$  en  $60$  min significant (Wilcoxon twee steekproeven toets, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Tijdens de hypoxie heeft de activiteit voor witte en grijze stof een maximum op  $t = 3$  uur van  $76,1 \pm 8,9$  resp.  $80,0 \pm 7,5\%$ .



Grafiek 13.  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine- activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

#### 4.3.5 lactaatdehydrogenase hypoxie serie

##### *Plasma*

Er is *geen significant* verschil gevonden tussen de waarden van de LDH-activiteit van  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrie-toets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Er blijkt *geen overeenstemming* aantoonbaar te zijn tussen het verloop van de activiteit bij negen katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 4,79$ ;  $C_{5;0,01} = 15,1$ ).

Hypoxie heeft dus geen meetbare invloed op de LDH-activiteit in plasma. De iso-enzymverdeling in plasma van negen katten, bepaald op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur is samengevat in tabel 23.

Er is een *sterke verhoging* van de  $\text{LDH}_1$  en  $\text{LDH}_2$ , een *sterke daling* van de  $\text{LDH}_3$  en een *minder sterke daling* van  $\text{LDH}_4$  en  $\text{LDH}_5$  in de relatieve verdeling van de LDH-iso-enzymen. Alle verschillen zijn significant aantoonbaar. Er blijken nauwelijks verschillen op te treden tussen de waarden op  $t = 5$  uur met die van de controleserie.

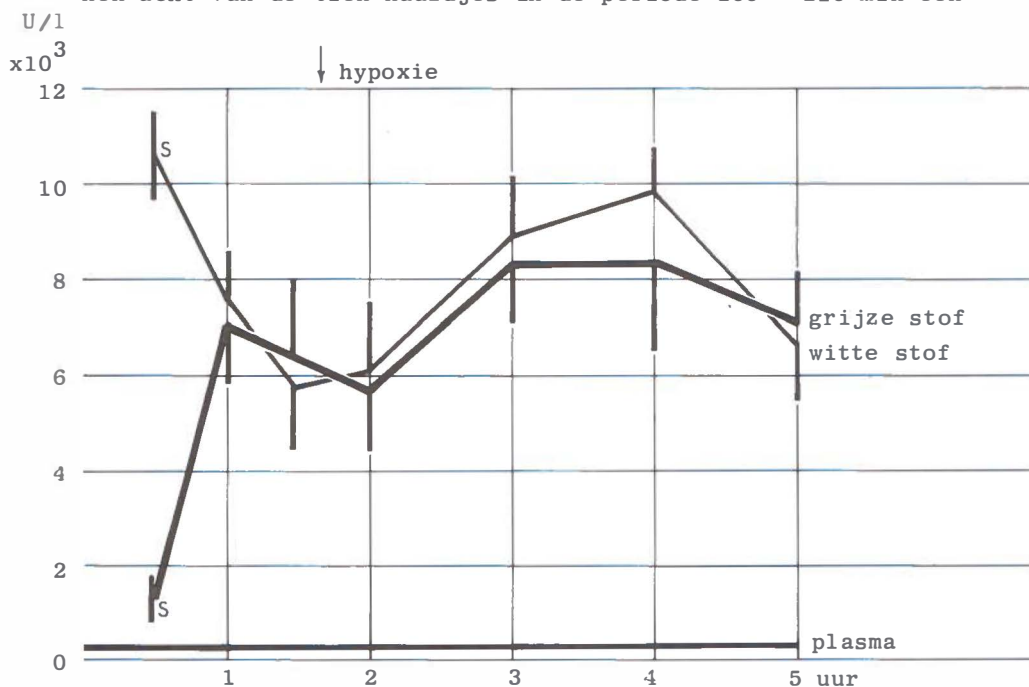
Tabel 23. Relatieve verdeling van LDH<sub>iso</sub> in plasma, uitgedrukt in procenten

		LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>
$\underline{t} = 0$ uur	$\bar{x}$	35,2	31,0	18,4	8,1	8,3
	SD	4,8	3,9	4,6	3,1	2,3
$\underline{t} = 5$ uur	$\bar{x}$	39,0	40,4	9,3	6,3	5,0
	SD	6,2	5,3	5,2	2,5	3,0
		(S)	(S)	(S)	(S)	(S)

Gemiddelde en SD voor de LDH<sub>iso</sub>-activiteit op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, gemeten bij 9 katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er significante (S) verschillen gevonden tussen paren waarden op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

### Oedeemvocht

Acht van de negen naaldjes tonen tot  $t = 100$  min een *verandering* blijkens de toetsingsgrootheid K. Na inductie van hypoxie vertonen acht van de tien naaldjes in de periode 100 - 210 min een



Grafiek 14. LDH-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

*stijging*. Negen van de tien naaldjes laten gedurende de laatste periode een *daling*, voor zowel de witte als de grijze stof zien. Grafiek 14 geeft het verloop weer van de activiteit in plasma en in oedeemvocht gedurende het experiment.

Alleen op  $t = 30$  min is er een significant verschil tussen witte en grijze stof. De maximale activiteit tijdens hypoxie voor witte en grijze stof op  $t = 4$  uur is  $9745 \pm 949$  resp.  $8300 \pm 1865$  U/l. Gewezen wordt op de grote verschillen die optreden tussen de controle en hypoxie serie op  $t = 3, 4$  en  $5$  uur inzake de activiteit in oedeemvocht uit witte en grijze stof (vergelijk grafieken 6 en 14).

De iso-enzymverdeling blijkt *niet af te wijken* van de  $LDH_{iso}$ , zoals die gevonden is bij katten in de controle serie. De maxima of minima, vóór of tijdens hypoxie stemmen in controle en hypoxie serie met elkaar overeen. Ondanks enkele kleine verschillen tussen waarden van beide series is er geen verschuiving in de verdeling meetbaar, die aan de geïnduceerde hypoxie kan worden toegeschreven.

#### 4.3.6 creatine-fosfokinase hypoxie serie

##### *Plasma*

Alleen over de tijdsintervallen  $t = 0$  uur t/m  $t = 5$  uur en  $t = 0$  uur t/m  $t = 1$  uur is een *daling* van de CPK-activiteit aantoonbaar (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Er is een *zekere overeenstemming* aangetoond tussen het verloop van de CPK-activiteit van negen katten (toets van Friedman,  $C_{plasma} = 18,87$ ;  $C_5 = 0,01 = 15,1$ ). Er treden *geen veranderingen* op in de iso-enzymverdeling tijdens hypoxie. Dit blijkt uit de visuele beoordeling na elektroforetische scheiding van CPK.

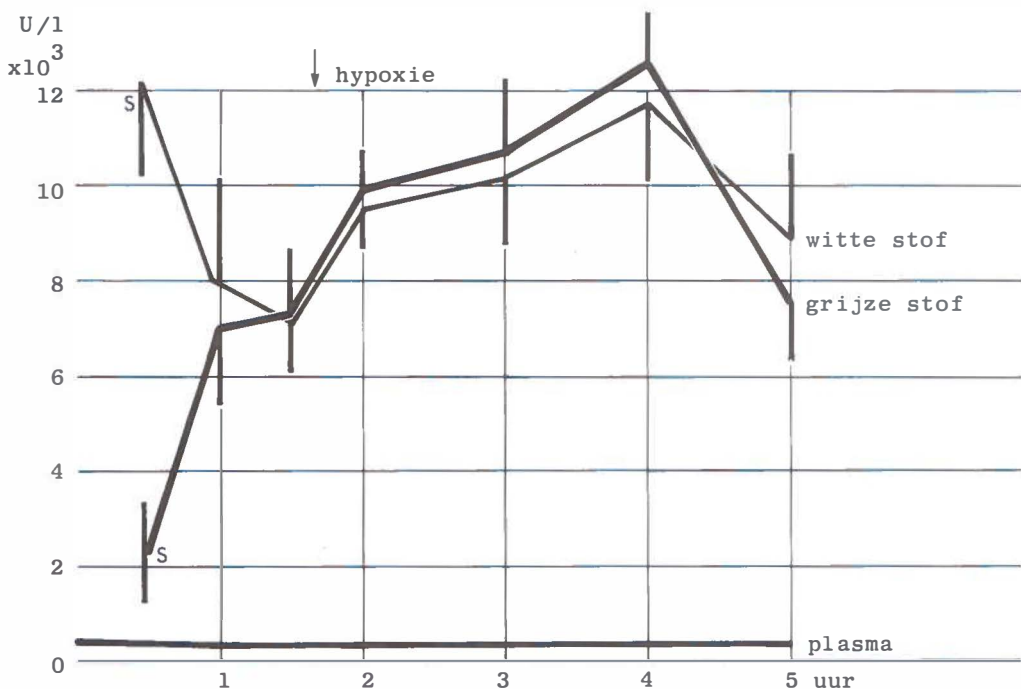
##### *oedeemvocht*

Vóór de inductie van de hypoxie is het verloop gelijk aan die van de controle serie, dat wil zeggen *dalend* voor de witte stof en *stijgend* voor de grijze stof. Dit volgt uit de resultaten van zeven producerende naaldjes.

Tijdens hypoxie is een *stijging* aantoonbaar voor zowel de witte als de grijze stof voor zes van de zeven naaldjes gedurende de periode tot  $t = 210$  min.

In de laatste periode is voor alle naaldjes, zowel in de witte als de grijze stof, een *daling* aangetoond.

In grafiek 15 zijn de CPK-activiteiten in plasma en oedeemvocht weergegeven.



Grafiek 15. CPK-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Er kan alleen een *significant verschil* worden aangetoond tussen de waarden van de witte en de grijze stof op  $t = 30$  min. Tijdens hypoxie stijgt de CPK-activiteit in witte en grijze stof naar een maximum van  $11783 \pm 1777$  resp.  $12559 \pm 1210$  U/l (vergelijk grafieken 8 en 15).

#### 4.3.7 liquor hypoxie serie

Van de negen proefdieren van deze serie waren slechts vier, waaruit liquor kon worden geïsoleerd door middel van een punctie van de cisterna magna. In onderstaande tabel zijn de samenvattingen weergegeven van de bepalingen op liquor van de controle en de hypoxie serie en van de blanco.

Ondanks het feit, dat de gemiddelden berekend zijn aan de hand van slechts vier liquormonsters - zodat vergelijkingen met andere series niet mogelijk zijn - geven de waarden in de laatste kolom van tabel 24 enig inzicht in de veranderingen ten opzichte van de controle serie en de blanco. De verandering der gemeten parameters van de hypoxie serie stemmen goed overeen met die van de hypoxie serie en wijken sterk af van de blancowaarden.



Tabel 24. Waarden van zes variabelen in liquor

	blanco (N = 22)	serie I (N = 18)	serie II (N = 4)
natrium	159,2 $\pm$ 5,1	147,8 $\pm$ 6,0	146,2 $\pm$ 8,8
kalium	3,34 $\pm$ 0,22	3,87 $\pm$ 0,40	4,49 $\pm$ 0,51
COP	0,55 $\pm$ 0,20	2,36 $\pm$ 1,42	5,34 $\pm$ 2,44
LDH	152,6 $\pm$ 35,4	1090 $\pm$ 543	3874 $\pm$ 612
CPK	6,64 $\pm$ 2,15	1019 $\pm$ 310	2688 $\pm$ 899
<sup>99m</sup> Tc-albumine	0	12,1 $\pm$ 2,4	7,5 $\pm$ 4,5

Natrium en kalium, uitgedrukt in mM, COP in mmHg, LDH en CPK in U/l en <sup>99m</sup>Tc-albumine in %-plasma-activiteit op tijdstip van liquorafname (= 5 uur na koude laesie)  $\pm$  SD

#### 4.3.8 conclusie en discussie hypoxie serie

Tijdens één van de experimenten in een "pilot study" werd een COP oedeemvocht bij twee proefdieren gevonden, die hoger was dan de COP plasma (Go, 1976). Oedeemvocht is van vasogene oorsprong. Dit vocht wordt tijdens de uitbreiding van het oedeem verdund met het ECF, deels afgevoerd naar de CSS, opgenomen door niet beschadigde cellen en vermengd met ICF. Zoals ook is gebleken uit de resultaten van de controle serie heeft het oedeemvocht een lager eiwitgehalte dan het plasma. Het verschijnsel dat de COP oedeemvocht de COP plasma overschrijdt zou men als volgt kunnen verklaren.

Door de aangebrachte koude laesie treedt een complex van veranderingen op. Beschadiging van de BBB veroorzaakt het binnendringen van bloedplasmafracties in de ECS met als gevolg een veranderde ECF-samenstelling. Er kan een sterk verhoogde ICP optreden die in onze experimenten soms opliep tot 2500 mmHg (intraventriculair gemeten). Het optreden van een ischaemie of hypoxie kan voor cellen fataal zijn als gevolg van de absolute afhankelijkheid van het hersenweefsel van een continu oxidatief metabolisme. Het lactaatgehalte zal sterk stijgen en het gehalte aan fosfocreatine en andere energierijke fosfaten zal dalen. Daarenboven wijst een daling van het gehalte van citraat,  $\alpha$ -ketoglutaraat en malaat op een aantasting van de citroenzuursyclus. Ondanks een hoge glycolyse daalt het zuurstofgehalte gedurende een hypoxie voldoende om de oxidatie van pyruvaat en het normale mitochondriale metabolisme te remmen (Lippmann, 1971; Broniszewska-Ardelt, 1971; Siegel, 1976).

Tabel 25.

	P <sub>aO<sub>2</sub></sub>	ATP	ADP	AMP	P-creat.	P	lactaat	pyruvaat
controle	100	3,06	0,272	0,031	4,98	11,37	1,69	0,107
hypoxie (licht)	28	3,07	0,342	0,039	4,31	10,79	5,86	0,250
hypoxie (zwaar)	21	3,00	0,384	0,046	3,11	9,49	14,31	0,297
hypoxie- oligaemie	<21	2,38	0,576	0,314	1,76	7,10	20,76	0,231

Concentratieveranderingen van energierijke stoffen en intermediairen in het koolwaterstofmetabolisme van rattehersen (naar Siegel, 1976)

Het cruciale punt hierbij is dat de actieve transportmechanismen door gebrek aan energie niet meer optimaal kunnen functioneren. Inhibitie van de Na-K-pomp zal de elektrolytgradiënt over het celmembraan veranderen: natriumionen stromen de cel binnen, kaliumionen stromen de cel uit. Water en chloor volgen passief het natrium. De cel en subcellulaire organellen zullen daarom zwellen (Leaf, 1970). Rapoport (1976a) noemt dit verschijnsel het "metabole oedeem". Omdat dit verschijnsel van evident belang is in de kliniek werden katten van de serie II behandeld met hypoxie.

In de eerste periode van het experiment tot de inductie van de hypoxie (op  $t = 100$  min) vertonen de resultaten van de oedeemvloeistofanalyse hetzelfde beeld als in de controle serie: de natriumconcentratie blijft constant en verschilt niet significant van de plasmawaarden; de kaliumconcentratie daalt na een onmiddellijk hoge beginwaarde in zowel de witte als de grijze stof. De radio-activiteit, COP en enzymenactiviteit vertonen een onmiddellijke stijging in het oedeemvocht van de witte stof. In de grijze stof blijkt het oedeemvocht zich langzamer uit te breiden, getuige de stijging in de beginfase van het experiment voor de radio-activiteit, COP en enzymenactiviteit. De hoge beginwaarden in het oedeemvocht van de  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine en COP wijst op de BBB-beschadiging; de hoge beginwaarden voor kalium, LDH en CPK wijzen op de celbeschadiging door bevriezing. De zeer lage, maar snel stijgende beginwaarden voor het oedeemvocht van de grijze stof geeft de vertraagde uitbreiding weer van hoogmoleculaire componenten van het exsudaat in de grijze stof. Tijdens de hypoxie is de belangrijkste verandering een verhoging van de COP en  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit, LDH- en CPK-activiteit en de kaliumconcentratie van het oedeemvocht in zowel de witte als de grijze stof. Alleen de natriumconcentratie blijkt onveranderd te zijn tijdens deze periode. De toename van de parameters (met uitzondering van natrium) tijdens de hypoxie kan worden uitgelegd als een concentratieverhoging van het vocht in de ECF en een afname van de extracellulaire ruimte ten gevolge van een verschuiving van water en natrium van de extracellulaire ruimte naar de

intracellulaire ruimte.

Het is reeds bekend dat er tijdens hypoxie een vloeistofverplaatsing naar de hersencellen optreedt, hetgeen een zwelling tot gevolg heeft. Dit blijkt uit de elektronenmicroscopische foto's van Webster (1965) en Yu (1972). Zoals reeds in het begin van 4.3.8 is opgemerkt kan deze vloeistofverplaatsing verklaard worden door het slecht functioneren van de Na-K-pompen gevolge van een energiedeficit tijdens hypoxie. Natrium, chloor en water stromen de cel binnen (Van Harreveld, 1959), terwijl kaliumionen de cel uitstromen ( $K_{icf} = + 150 \text{ mM}$ ) naar de ECS (Blank, 1976), waar het zich in onze experimenten vermengt met het oedeemvocht (8 - 10 mM). Grijze stof bevat veel neuronen en heeft een hogere metabolische activiteit dan de witte stof (Siegel, 1976). Het lijkt voor de hand te liggen dat een hypoxie eerder de grijze stof zal aantasten dan de witte stof. Toch blijkt een hypoxie de witte stof meer aan te tasten dan de grijze stof (Feigin, 1973). Volgens Feigin is dit het gevolg van het gelijktijdig voorkomen van hypoxie en oedeem. Deze bewering lijkt overeen te stemmen met onze resultaten wat betreft de verschillen op  $t = 2, 3$  en  $4$  uur voor de witte en de grijze stof.

Hoewel natriumionen de cel binnenstromen tijdens de hypoxie daalt de natriumconcentratie in het oedeemvocht niet. Dit is hoogstwaarschijnlijk het gevolg van het gecombineerde effect van natriumflux naar de ICS en de afname van de ECS ten gevolge van celzwelling. De ECS (normaal 18 - 20%) neemt na een koude laesie toe met  $7,2 \pm 0,6\%$  voor de totale hemisfeer en  $18,9 \pm 3,6\%$  berekend voor de oedemateuze witte stof (Streicher, 1964). In welke mate de ECS bij vasogeen oedeem, gevolgd door een hypoxie, afneemt blijkt uit onze impedantieproeven (4.7.4). Deze proeven zijn uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden als beschreven in deze serie. Het uitblijven van een verandering van de natriumconcentratie in oedeemvocht zou erop kunnen wijzen, dat de verplaatsing van natriumionen naar de ICS evenredig is met de verkleining van de ECS.

Bij de stijging van de concentratie van macromoleculen blijkt  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit 1,2 maal te zijn toegenomen; de COP neemt met een factor 1,9 toe. De LDH resp. CPK zijn echter 4,5 resp. 6 maal in activiteit gestegen. Deze onevenredige stijging van LDH en CPK tijdens hypoxie zou kunnen wijzen op het vrijkomen van cellulaire enzymen. De betreffende cellen moeten derhalve permeabel zijn geworden voor macromoleculen. In welke mate dit gebeurt is nog niet geheel duidelijk. Felgenhauer (1977, persoonlijke mededeling) heeft in elektroferogrammen van oedeemvocht geen cellulaire eiwitten kunnen aantonen, ondanks de grote celbeschadiging, getuige de hoge enzymactiviteit. De hoeveelheid enzymmoleculen, die deelnemen aan de vorming van de COP zou zo laag kunnen zijn, dat een toename met een factor 4,5 en 6 voor resp. LDH en CPK tijdens hypoxie niet hoeft bij te dragen tot de COP-verhoging.

## 4.4 serie III "ouabaine"

Ouabaine (Strophantine G) is een stof, die behoort tot de groep der hartglycosiden. Ouabaine is een specifieke remmer van het enzym Na-K-afhankelijk ATPase. Dit membraangebonden enzym zorgt voor een gradiënt van natrium en kalium over het celmembraan. Intracerebrale injectie van ouabaine veroorzaakt zwelling van o.a. astrocyten, dendrieten, Golgi-apparaat en endoplasmatisch reticulum, zoals blijkt uit onderzoeken van Tanaka (1977) Cornog (1967) en Towfighi (1973). Celzwelling moet worden veroorzaakt door het specifiek blokkeren van het pompmechanisme, waardoor kaliumionen de cel uitstromen, terwijl natriumionen de cel binnenstromen, passief gevolgd door water en chloorionen. In ons onderzoek hebben wij het intracerebraal injecteren van ouabaine opgenomen om na te gaan, of het effect van toediening van ouabaine overeenstemming vertoont met die van hypoxie. Daartoe werd een 0,025 ml isotone zoutoplossing van ouabaine ( $3 \times 10^{-4}$  M) intracerebraal ingespoten via naaldje 8 mm op tijdstip  $t = 100$  min. De osmolariteit van de oplossing was 287 mOsmol. Als controle werden proefdieren na de koude laesie op tijdstip  $t = 100$  min ingespoten met alleen een isotone zoutoplossing (Serie IV).

Ook bij deze serie werd de toetsingsgrootheid K berekend over drie tijdsperiodes, te weten 0 - 100, 100 - 210 en 210 - 300 min.

### 4.4.1 colloidomotische druk (COP) ouabaine serie

#### *Plasma*

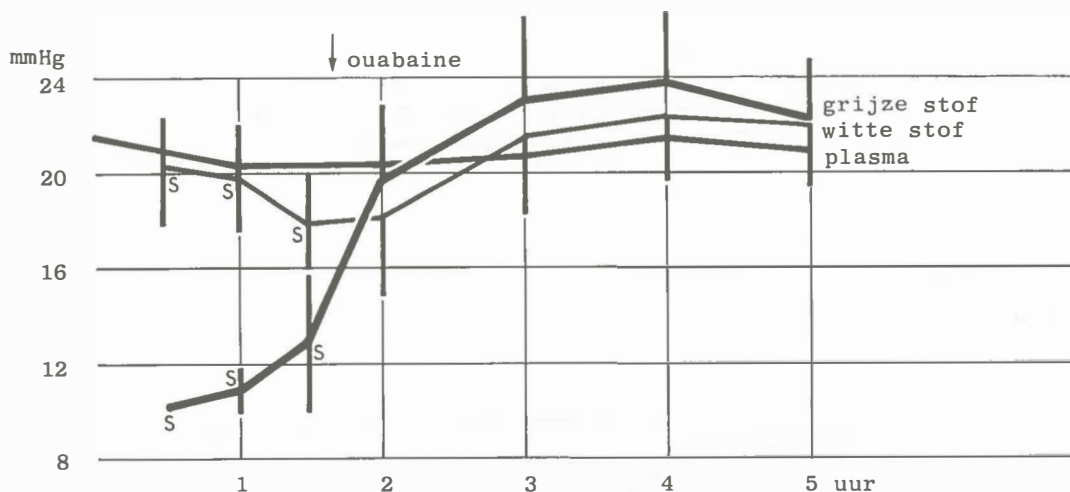
Er is *geen verandering* van de COP in plasma van negenkatten gevonden tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Met behulp van de toets van Friedman kan *geen overeenstemming* tussen het verloop van de COP bij negen katten worden aangetoond ( $C_{\text{plasma}} = 4,14$ ;  $C_5; 0,01 = 15,1$ ).

#### *oedeemvocht*

Er kan een *stijging* voor de grijze en een *daling* voor de witte stof worden aangetoond gedurende de eerste periode (0 - 100 min) voor zeven producerende naaldjes. Slechts twee naaldjes (10 en 12 mm) tonen *geen stijging* blijkens de toetsingsgrootheid K. Na toediening van de ouabaine treedt een *stijging* op in de COP voor zowel de naaldjes in de witte als de grijze stof (met uitzondering van 4 en 7 mm). Na een maximum op  $t = 4$  uur blijkt een *daling* voor slechts drie van de zeven naaldjes aantoonbaar.

In grafiek 16 is het verloop weergegeven van de COP<sub>plasma</sub> en de COP<sub>oedeemvocht</sub>, geïsoleerd uit witte en grijze stof.



Grafiek 16. Verandering van de COP voor plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

In de grafieken 1, 10 en 16 zien wij de overeenkomst in verloop tot  $t = 100$  min, nl. de hoge en lage beginwaarden voor witte resp. grijze stof. Na  $t = 100$  min vertonen alleen de grafieken 10 en 16 nog overeenkomst in verloop. In deze serie ligt het maximum op  $t = 4$  uur met een COP van  $22,2 \pm 2,5$  en  $23,7 \pm 2,7$  mmHg voor witte resp. grijze stof. Tijdens hypoxie ligt het maximum eveneens op  $t = 4$  uur met een COP van  $23,3 \pm 2,9$  resp.  $23,3 \pm 3,5$  mmHg.

#### 4.4.2 natrium ouabaine serie

##### Plasma

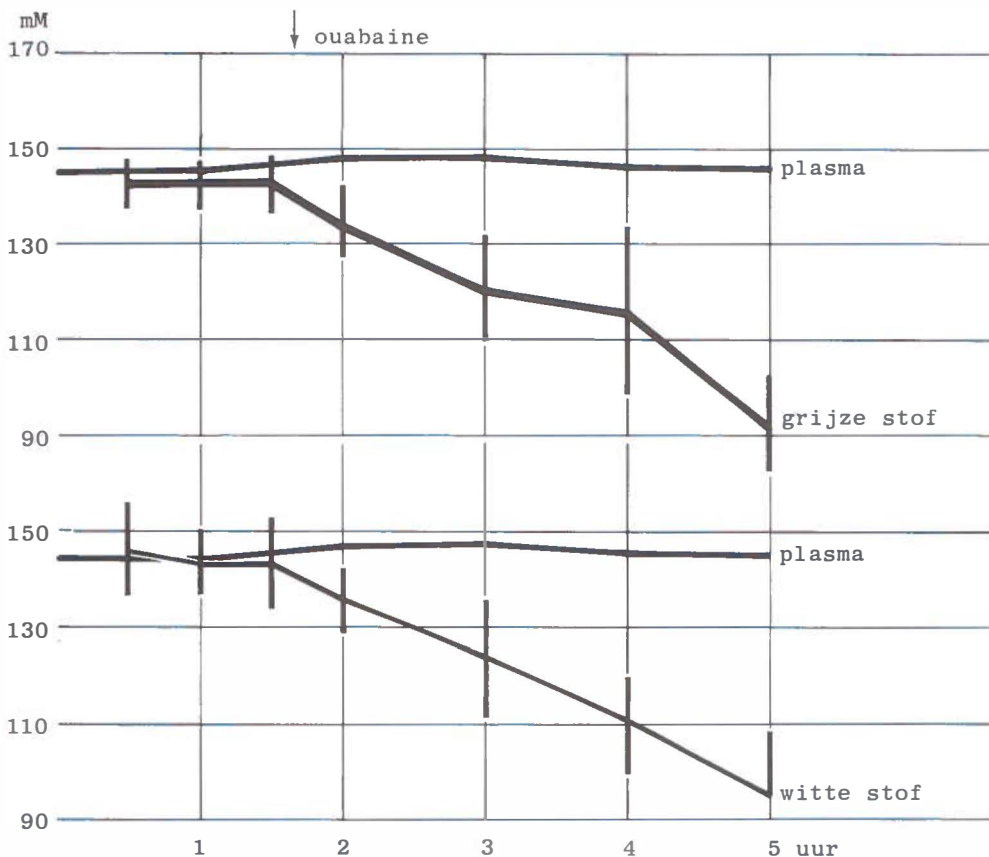
Er is *geen verandering* van de natriumconcentratie in plasma van negen katten tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrische toets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er kan *geen overeenstemming* tussen het verloop van de natriumconcentratie bij negen katten worden aangetoond (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 7,68$ ;  $C_{5, 0,01} = 15,1$ ).

Deze resultaten stemmen overeen met die van de hypoxie serie.

Tijdens de eerste periode vertonen alle acht producerende naaldjes *geen verandering*. Na toediening van de ouabaine is tot het einde van het experiment een *daling* aangetoond voor zowel witte als grijze stof. Slechts naaldje 11 mm vertoont geen enkele verandering gedurende de derde periode.

In grafiek 17 zijn de gemiddelde waarden van de  $(Na^+)_{\text{plasma}}$  en  $(Na^+)_{\text{oedeemvocht}}$  van de witte en grijze stof weergegeven.



Grafiek 17.  $(Na^+)$  in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Verrassend is de grote daling van het natriumgehalte in oedeemvocht; dit is in tegenstelling met de niet significante veranderingen in de  $(Na^+)_{\text{oedeemvocht}}$  van de hypoxie serie.

#### 4.3 kalium ouabaine serie

##### Plasma

Alleen over de tijdsintervallen van 1 - 2 uur en 2 - 3 uur is een *stijging resp. daling* aangetoond (Wilcoxon symmetrietoets, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

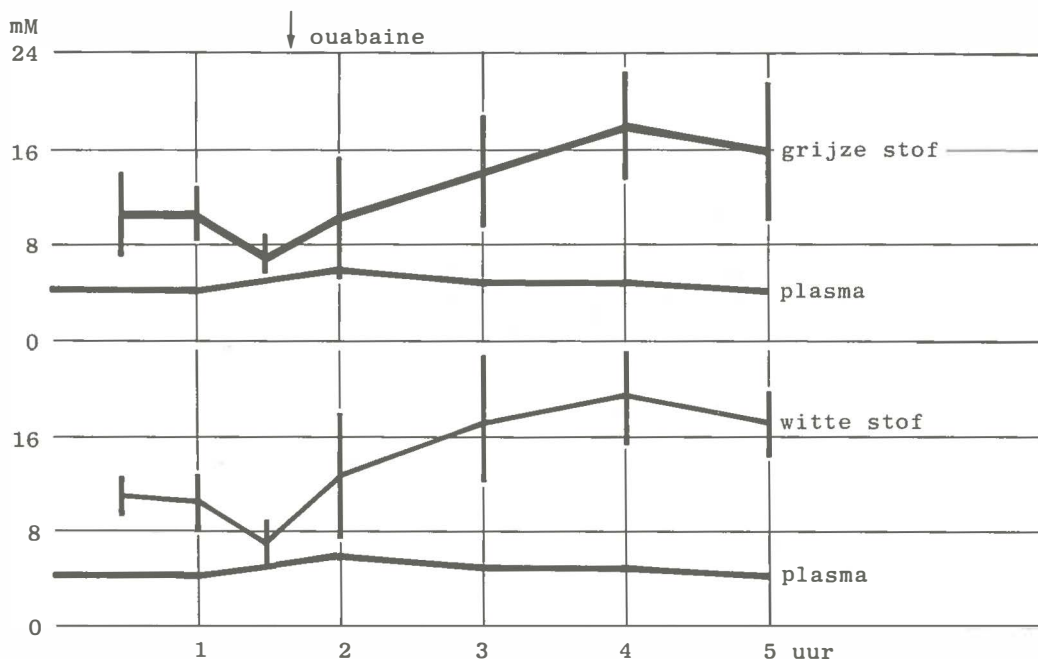
Er is een *zekere overeenstemming* in verloop tussen de  $(K^+)$  plasma van de negen katten (toets van Friedman  $C_{\text{plasma}} = 18,3; C_5 = 0,01 = 5,1$ ).

##### Oedeemvocht

Voor zeven van de negen naaldjes is er een *daling* van de  $(K^+)$  gevonden voor zowel witte als grijze stof gedurende de eerste periode.

De *stijging* na toediening van ouabaine is voor alle naaldjes aangetoond met uitzondering van naaldje 5 mm tot het maximum op  $t = 4$  uur. De *lichte daling* is voor geen van de naaldjes significant aantoonbaar met uitzondering van naaldje 4mm.

In grafiek 18 zijn de  $(K^+)$  plasma en de  $(K^+)$  oedeemvocht weergegeven.



Grafiek 18.  $(K^+)$  in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Ook bij deze serie zien wij - evenals tijdens de hypoxie - een maximum op  $t = 4$  uur van  $19,4 \pm 3,1$  en  $18,0 \pm 4,0$  mM voor de witte resp. grijze stof. Hier blijken dus *geen significante verschillen* op te treden op  $t = 3, 4$  en  $5$  uur.

#### 4.4.4 $^{99m}\text{Tc}$ -albumine ouabaine serie

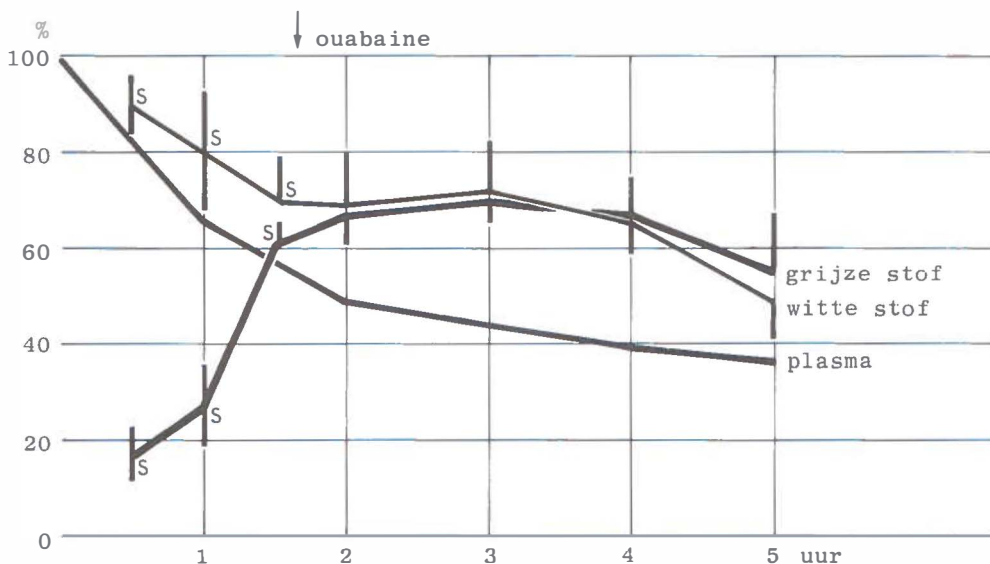
##### Plasma

Er is een *daling* van de radio-activiteit in plasma van negen katten gevonden, als ook een *daling* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er bestaat een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de radio-activiteit gedurende het gehele experiment (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 30$ ;  $C_{5, 0,01} = 15,1$ ). De daling verloopt van 4918 cpm/cm (= 100%) naar 1810 cpm/cm (=  $36,8 \pm 6,8\%$ ) en is nage-noeq gelijk aan de resultaten van de controle en hypoxie serie.

##### Oedeemvocht

Zes van de negen naaldjes vertonen een *verandering* in het verloop van de radioactiviteit tijdens de eerste periode van het experiment. Slechts drie naaldjes (10, 11, 12 mm) vertonen een *stijging* gedurende de tweede periode, terwijl een *daling* gedurende de laatste periode voor alle negen producerende naaldjes aangetoond is.



Grafiek 19.  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.



De stijging na  $t = 100$  min - met een maximum op  $t = 3$  uur - is niet erg overtuigend; de maxima van  $70,4 \pm 11,1$  en  $69,9 \pm 4,2$  liggen lager dan in de hypoxie serie met waarden van  $76,1 \pm 8,9$  en  $80,0 \pm 7,5$  voor witte resp. grijze stof. Men moet hierbij echter wel de activiteiten op  $t = 90$  en  $120$  min in beschouwing nemen. De daling gedurende de laatste twee uur van de experimenten (15 - 20%) komt echter wel goed overeen met de afname in de hypoxie serie tijdens dezelfde periode (14 - 18%).

#### 4.4.5 lactaatdehydrogenase ouabaine serie

##### Plasma

Er is *geen verandering* van de LDH in plasma van negen katten gevonden tussen de waarden  $t = 0$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Met behulp van de toets van Friedman kan *geen overeenstemming* tussen het verloop van de LDH worden aangetoond ( $C_{\text{plasma}} = 4,32$ ;  $C_{5;0,01} = 15,1$ ). De iso-enzymverdeling in plasma op tijdstippen  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur is bepaald bij negen katten. De waarnemingen zijn samengevat in tabel 26.

Tabel 26. Relatieve verdeling van LDH<sub>iso</sub> in plasma uitgedrukt in procenten

$t = 0$ uur	$\bar{x}$	34,8	29,6	18,8	8,8	8,0
	SD	3,8	4,1	3,9	3,6	2,9
$t = 5$ uur	$\bar{x}$	37,9	39,4	10,9	6,1	5,7
	SD	3,7	4,3	2,8	6,1	2,0
		(S)	(S)	(S)	(S)	(S)

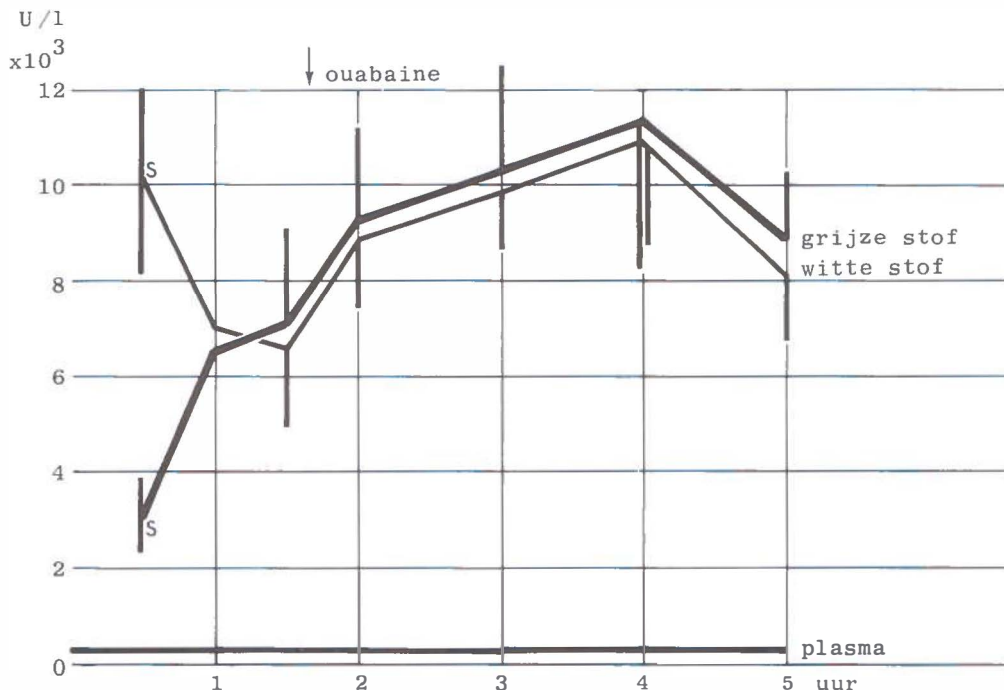
Gemiddelde en SD voor de LDH<sub>iso</sub>-activiteit op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, gemeten bij 9 katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er significante (S) verschillen gevonden tussen de paren waarden op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is een *sterke verhoging* van de LDH<sub>1</sub> en LDH<sub>2</sub>, een *sterke daling* van de LDH<sub>3</sub> en een *iets minder sterke daling* van de LDH<sub>4</sub> en LDH<sub>5</sub> in de relatieve verdeling. Alle verschillen zijn significant aantoonbaar.

Er zijn *geen significante verschillen* aantoonbaar tussen de iso-enzymverdeling van de controle en de ouabaine serie en tussen de hypoxie en de ouabaine serie (Wilcoxon tweestekproeventoets, tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ).

De meeste naaldjes vertonen tot  $t = 100$  min een *verandering* (met uitzondering van 10 en 11 mm). Gedurende de tweede periode kan een *stijging* in de LDH-activiteit van de meeste naaldjes worden aangetoond (met uitzondering van 9 en 11 mm). Tijdens de laatste periode is voor alle acht producerende naaldjes een *daling* gevonden.

In grafiek 20 zijn de gemiddelde activiteiten van  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine in plasma en oedeemvocht waargegeven.



Grafiek 20. LDH-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde de SD aan.

Ook hier is - evenals bij de hypoxie serie - alleen op  $t = 30$  min een significant verschil tussen de activiteit in oedeemvocht van witte en grijze stof. De activiteit bereikt een maximum op  $t = 4$  uur van  $10972 \pm 2234$  en  $11319 \pm 2998$  U/l voor witte resp. grijze stof. Het verloop van de LDH-activiteit in zowel plasma als in oedeemvocht van de hypoxie en ouabaine serie komen goed met elkaar overeen (grafiek 14 en 20).

De iso-enzymverdeling in oedeemvocht van witte en grijze stof vertoont *geen verschil* met de relatieve verdeling van de controleserie (grafiek 7).

#### 4.4.6 creatine-fosfokinase ouabaine serie

##### Plasma

Alleen over de tijdsintervallen  $t = 0$  t/m  $t = 5$  uur en  $t = 0$  t/m  $t = 1$  uur is een *daling* van de CPK-activiteit aangetoond (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er is een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de CPK-activiteit van negen katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 21,44$ ;  $C_{5;0,01} = 15,1$ ).

Er *traden geen veranderingen* op in de iso-enzymverdeling na toediening van ouabaine. Dit blijkt uit de visuele beoordeling na elektroforetische scheiding van de CPK.

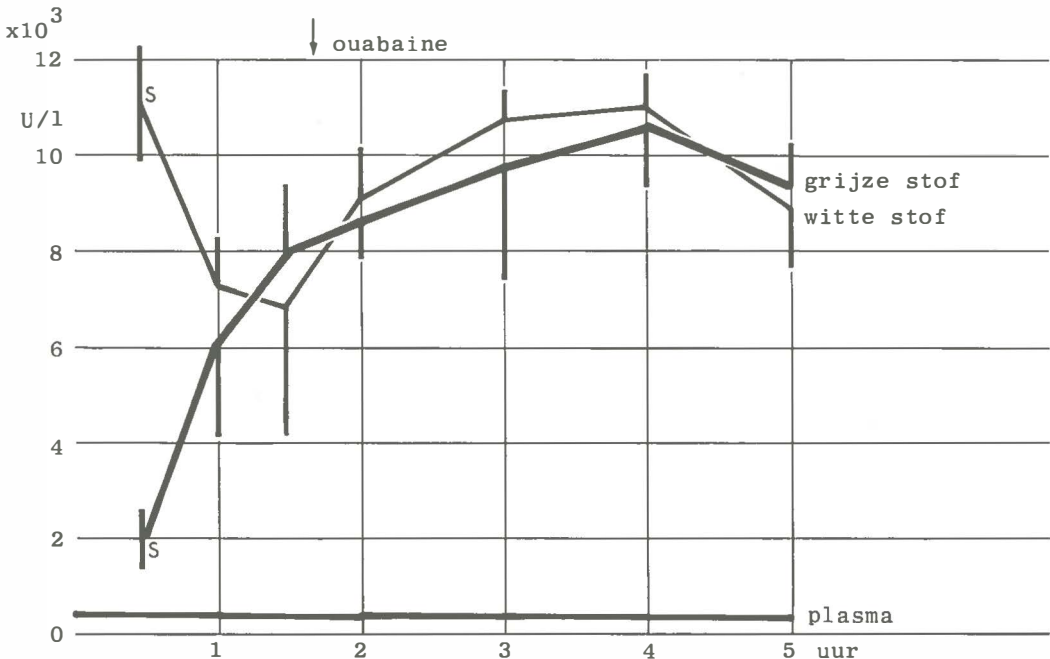
##### Oedeemvocht

Alle zeven producerende naaldjes tonen een *verandering* gedurende de eerste periode van het experiment.

Tijdens de tweede periode kan voor zes naaldjes in de witte en de grijze stof een *stijging* worden aangetoond.

Een *daling* gedurende de derde periode is voor vijf naaldjes gevonden.

Grafiek 21 toont het verloop in activiteit in plasma en oedeemvocht van witte en grijze stof.



Grafiek 21. CPK-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Het verloop van de CPK-activiteit vóór toediening van de ouabaine vertoont hetzelfde beeld als in de controle en hypoxie serie. Na de toediening van ouabaine *stijgt* de activiteit in zowel witte als grijze stof naar een maximum van  $10892 \pm 866$  resp.  $10450 \pm 1210$  U/l op  $t = 4$  uur. De iso-enzymverdeling na toediening van ouabaine behoudt *dezelfde verdeling* als gevonden is in de controle en hypoxie serie; dit houdt in 96% (SD = 3,2) voor het CPK<sub>BB</sub> en 4% (SD = 2,9) voor het CPK<sub>MM</sub>.

#### 4.4.7 liquor ouabaine serie

Van de negen proefdieren van deze serie waren slechts drie katten, waaruit liquor kon worden geïsoleerd. Als blanco gelden de waarden zoals vermeld in tabel 21.

Tabel 27. Waarden van zes variabelen in liquor

	blanco (N = 22)		serie III (N = 3)	
natrium	159,2	$\pm 5,1$	146,9	$\pm 9,8$
kalium	3,34	$\pm 0,22$	4,05	$\pm 0,21$
COP	0,55	$\pm 0,20$	4,92	$\pm 1,12$
LDH	152,6	$\pm 35,4$	2978	$\pm 1220$
CPK	6,64	$\pm 2,15$	2188	$\pm 744$
<sup>99m</sup> Tc-albumine	0		7,1	$\pm 3,9$

Natrium en kalium uitgedrukt in mM, COP in mmHg, LDH en CPK in U/l en <sup>99m</sup>Tc-albumine in % plasma-activiteit op het tijdstip van liquorafname (5 uur na koude laesie);  
 $\pm$  SD

Ook hier is het toepassen van statistische methoden ter vergelijking van beide series niet mogelijk vanwege het lage aantal monsters in serie III (N = 3). Toch geven de gevonden concentraties en activiteiten van de zes parameters van liquor enig inzicht in de veranderingen, die optreden na een koude laesie (vergelijk de waarden in tabel 24 met die van tabel 27)

Tijdens de eerste periode van het experiment tot het tijdstip van intracerebraal geïnjecteerde ouabaine vertonen de resultaten van de oedeemvloeistofanalyse zeer sterke overeenkomsten met de controle serie en de hypoxie serie vóór de inductie van de hypoxie. Door de cellulaire beschadiging worden onmiddellijk hoge beginwaarden gevonden voor de kaliumconcentratie, LDH- en CPK-activiteit in oedeemvocht van de witte en de grijze stof. Alleen voor de LDH en CPK van de grijze stof wordt een minder snelle stijging gemeten in de beginfase direct na de koude laesie. Dit is het gevolg van de remmende invloed van de grijze stof op de beweging van hoogmoleculaire eiwitten. Hetzelfde effect wordt gevonden voor de COP en  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit. De parameters voor de BBB-beschadiging,  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine en COP, vertonen hetzelfde effect, namelijk een onmiddellijke stijging van de radio-activiteit en COP in oedeemvocht van de witte stof en een minder snelle stijging voor de grijze stof. De natriumconcentratie in oedeemvocht van de witte en de grijze stof blijft constant en verschilt niet significant van de plasma-waarden.

Na toediening van de ouabaine volgen een groot aantal veranderingen.

De COP, radio-activiteit, LDH- en CPK-activiteit en de kaliumconcentratie in oedeemvocht vertonen voor zowel de witte als de grijze stof een stijging. De natriumconcentratie in oedeemvocht van beide weefselcompartimenten laat echter een sterke daling zien. Met uitzondering van de daling van de natriumconcentratie lopen de veranderingen van de andere parameters parallel aan die van de hypoxie. De verandering van de oedeemvloeistofsamenstelling kan worden uitgelegd als het concentreren van het exsudaat, een verkleining van de ECS en een verschuiving van water en natrium van de ECS naar de ICS ten gevolge van een inhibitie van de Na-K-pomp.

Dit zogenaamde "indikkingseffect" is reeds uitvoerig besproken in de discussie van de hypoxie serie. De afname van de ECS - die in eerste instantie vergroot was door de oedeemvorming - is eveneens aangetoond met behulp van de impedantiemetingen in hersenweefsel van een vergelijkbare serie proefdieren.

Van ouabaine is bekend, dat het de swelling van o.a. dendriten veroorzaakt na intracerebrale toediening (Towfighi, 1973; Gonatas, 1973; Tanaka, 1977), terwijl gliacellen in een medium van ouabaine resulteert in de swelling van de astrocyten (Renkawek, 1970). Ook in de ouabaine serie zien wij een onevenredig indikkingseffect voor een aantal parameters op  $t = 4$  uur:

COP (mmHg)	12,4	23	1,9 x	23	1,9 x
<sup>99m</sup> Tc-albumine(%)	60	70	1,2 x	66	1,1 x
LDH (x10 <sup>3</sup> U/l)	2	9	4,5 x	11	5,5 x
CPK (x10 <sup>3</sup> U/l)	2	12	6 x	11	5,5 x

Opmerkelijk is de overeenkomst tussen de indikking bij de hypoxie en ouabaine serie. Dit onderstreept de onderstelling dat de gevolgen van hypoxie en ouabaine zeer sterke overeenkomsten vertonen.

De significante daling van (Na<sup>+</sup>) in oedeemvocht schijnt in tegenstelling tot de onveranderde concentraties in de hypoxie serie, veroorzaakt te worden door de grotere invloed van ouabaine op het Na-K-pompmechanisme dan de hypoxie. Naar alle waarschijnlijkheid is de mate van hypoxie in onze experimenten onvoldoende geweest om de pomp geheel uit te schakelen.

De verhoging van de (K<sup>+</sup>) in oedeemvocht na toediening van de ouabaine is eveneens het resultaat van het blokkeren van de Na-K-pomp, zodat intracellulair kalium naar de ECS kan stromen, alwaar het zich kan vermengen met het oedeemvocht. De verkleining van de ECS kan dit concentratieverhogende effect versterken.

Wij kunnen concluderen dat het niet optimaal functioneren van de Na-K-pomp van hersencellen, ten gevolge van een ouabaine-intoxicatie, resulteert in de opname van water en natrium uit het oedeemvocht door cellulaire elementen. Dit heeft een zwelling van cellen, verkleining van de ECS en een verhoging van de concentratie van hoogmoleculaire stoffen tot gevolg.

De relevantie van deze serie experimenten is gelegen in de mogelijkheid tot het analyseren van extracellulair vocht, dat dient als een *in vivo* medium, waarin uitwisseling van stoffen met extracellulaire elementen eenvoudig en snel meetbaar zijn.

Voor een algemeen vergelijkend overzicht zij verwezen naar blz. 135: "Het onderlinge verband tussen de series I t/m IV". Daar is het verloop der verschillende parameters weergegeven van de vier series proefdieren.

## 4.5 serie IV "fysiologisch zout"

Bij een groep van 8 katten werd intracerebraal een isotone zoutoplossing geïnjecteerd. Het uitvoeren van deze proef is noodzakelijk als controle op het intracerebraal injecteren van ouabaine.

Daartoe werd via naaldje 8 mm 0,025 ml isotone zoutoplossing op  $t = 100$  min ingespoten. Evenals bij de ouabaine serie werd de toetsingsgrootheid  $K$  berekend over de drie tijdsperioden  $0 - 100$ ,  $100 - 210$  en  $210 - 300$  min. Bij het bespreken van de resultaten zal niet alleen verwezen worden naar de ouabaine serie maar tevens naar de controle serie, omdat - indien het isotone zout geen effect heeft op het hersenweefsel - serie IV nagenoeg dezelfde resultaten zal opleveren.

### 4.5.1 colloidosmotische druk (COP) fysiologisch zout serie

#### *Plasma*

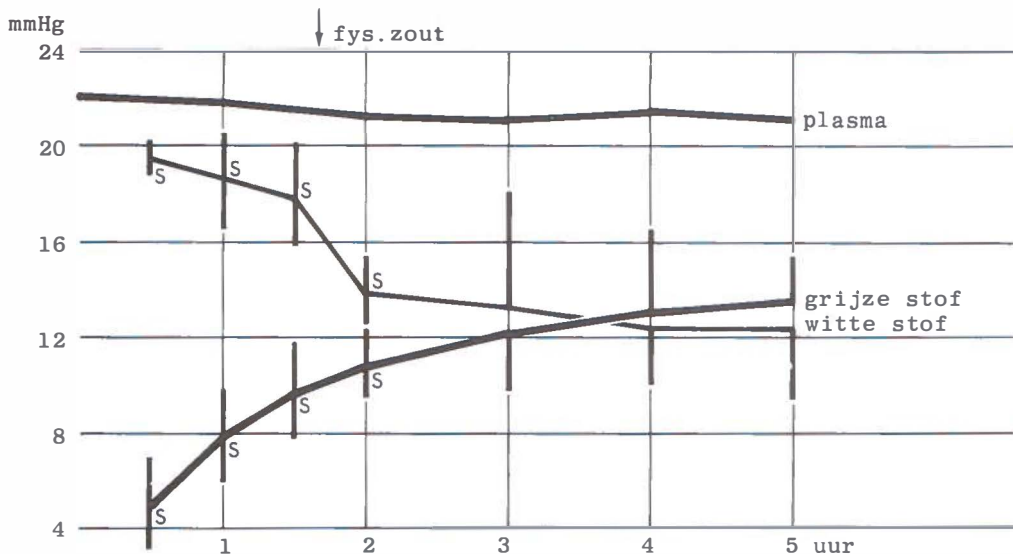
Er is *geen verandering* van de COP is plasma van acht katten gevonden tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrie-toets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Met behulp van de toets van Friedman kan *geen overeenstemming* tussen het verloop van de COP worden aangetoond ( $C_{\text{plasma}} = 4,74; C_5; 0,01 = 15,1$ ).

#### *Oedeemvocht*

Het verloop van de COP is gedurende het gehele experiment als bij de controle serie: er is een *daling* voor de witte stof en een *stijging* voor de grijze stof in het verloop van de COP gedurende de eerste periode gevonden voor alle negen naaldjes. Gedurende de twee periode vertonen slechts vier naaldjes een *verandering*, terwijl gedurende de derde periode alleen voor naaldje 11 mm een daling is gevonden. De resultaten volgen uit de waarden en het teken van toetsingsgrootheid  $K$ . In grafiek 22 is het verloop van de COP van plasma en oedeemvocht weergegeven.

Deze grafiek toont, in tegenstelling tot grafiek 16 van de ouabaine serie een sterke overeenkomst met grafiek 1 van de controle-serie.



Grafiek 22. Verandering van de COP voor plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

#### 4.5.2 natrium fysiologisch zout serie

##### Plasma

Er is *geen verandering* van de  $(Na^+)$  in plasma van acht katten tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er kan *geen overeenstemming* tussen het verloop van de  $(Na^+)$  van acht katten worden aangetoond (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 3,04$ ;  $C_5 = 0,01$  = 15,1).

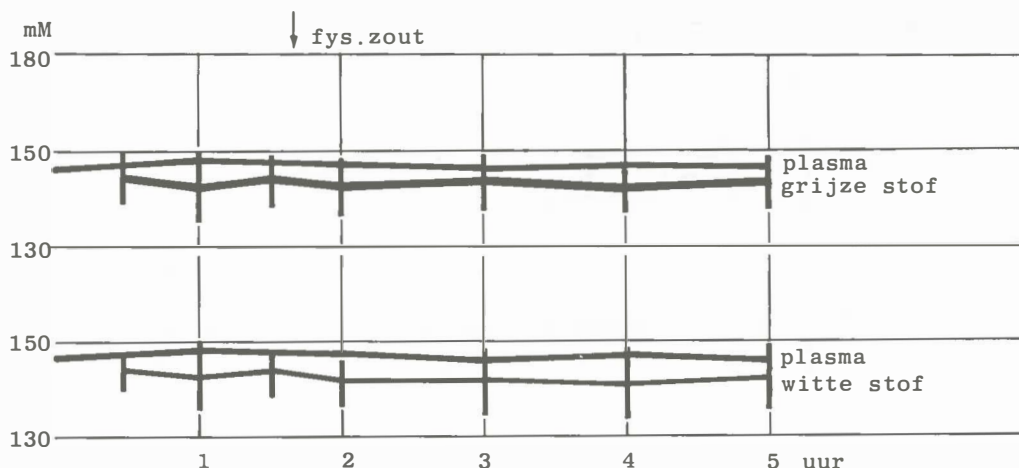
##### Oedeemvocht

De meeste naaldjes tonen gedurende het gehele experiment *geen verandering* in het verloop van de  $(Na^+)$ . Voor slechts twee van de acht naaldjes, die oedeemvocht leverden, is een *stijging* gedurende de tweede periode gevonden blijktens toetsingsgrootte K.

De waarden van het natriumgehalte in plasma en oedeemvocht zijn in grafiek 23 weergegeven.

Na  $t = 100$  min gaat het natriumgehalte in oedeemvocht niet dalen, zoals wij gezien hebben in de ouabaine serie.





Grafiek 23.  $(Na^+)$  in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

#### 4.5.3 kalium fysiologisch zout serie

##### *Plasma*

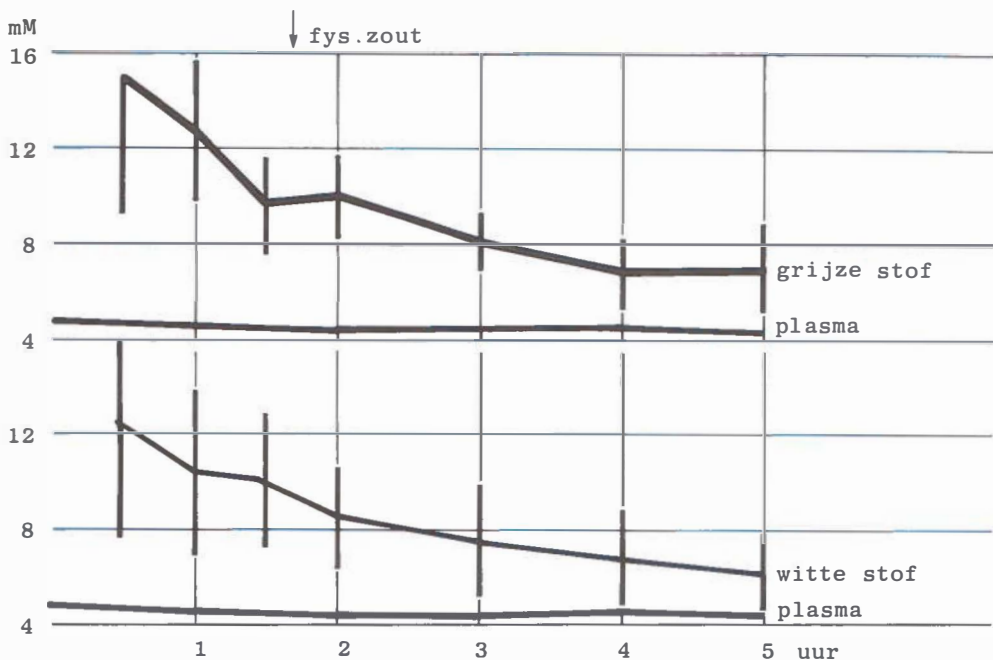
Er is *geen verandering* van de  $(K^+)$  gevonden tussen de waarden van  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een significant verschil* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er bestaat *geen overeenstemming* tussen het verloop van de  $(K^+)$  van acht katten gedurende het experiment (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 8,38; C_5; 0,01 = 15,1$ ).

##### *oedeemvocht*

Vrijwel alle naaldjes vertonen gedurende het gehele experiment een *daling* van de  $(K^+)$ . Vijf van de acht producerende naaldjes tonen echter *geen verandering* gedurende de derde periode. In grafiek 24 zijn de gemiddelde waarden van het kaliumgehalte in plasma en oedeemvocht weergegeven.

Uit onderstaande grafiek volgt, dat er een grote mate van overeenstemming bestaat met de resultaten van de controle serie. Na toediening van het isotone zout zet de daling na  $t = 100$  min voort, in tegenstelling tot de stijging van het kaliumgehalte in oedeemvocht na  $t = 100$  min in de ouabaine serie .



Grafiek 24. ( $K^+$ ) in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

#### 5.4 $^{99m}\text{Tc}$ -albumine fysiologisch zout serie

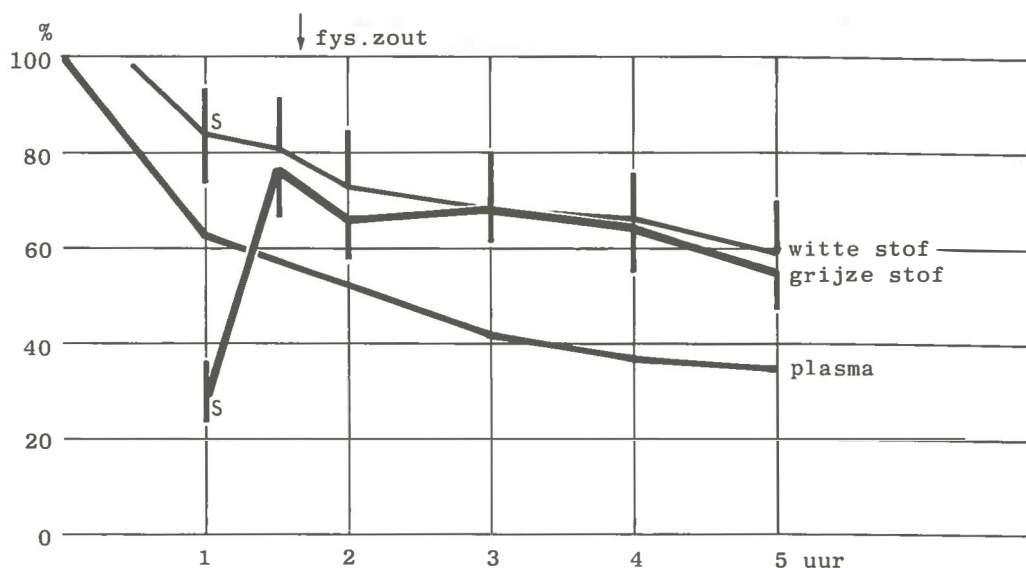
##### Plasma

Er is een *daling* van de radio-activiteit in het plasma van acht katten tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, als ook een *daling* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrie-toets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Er bestaat een *zekere overeenstemming* tussen het verloop van de radioactiviteit tijdens het gehele experiment (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 30$ ;  $C_5; 0,01 = 15,1$ ).

##### oedeemvocht

Zeven van de acht naaldjes tonen gedurende de periode tot  $t = 100$  min een *verandering*. Gedurende de tweede periode is voor slechts drie naaldjes een *daling* gevonden, terwijl tijdens de derde periode een *daling* in de radio-activiteit van oedeemvocht voor vier naaldjes is gevonden.



Grafiek 25.  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine- activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

Door het ontbreken van waarden op  $t = 30$  min en de onverklaarbare hoge waarde op  $t = 90$  min voor de grijze stof en slechts één bepaling op  $t = 30$  min voor de witte stof is het verloop gedurende de eerste periode niet goed vergelijkbaar met enig andere serie.

De hoge waarde ( $75,8 \pm 6,5\%$ ) op  $t = 60$  min voor de grijze stof werkt enigszins verwarrend. Het geeft de indruk dat na een aanvankelijke daling tot  $65,6 \pm 7,6\%$  op  $t = 120$  min er een stijging optreedt naar  $67,5 \pm 5,1\%$  op  $t = 180$  min. Men is geneigd dit effect toe te schrijven aan de toegediende isotone zoutoplossing. De daling gedurende de laatste twee uur van de experimenten bedraagt 9 - 14%, hetgeen niet in overeenstemming is met de resultaten van de controleserie (14 - 16%) of de hypoxie serie (15 - 20%).

#### 4.5.5 lactaatdehydrogenase fysiologisch zout serie

##### *Plasma*

Er is *geen verandering* van de LDH in plasma van de acht katten tussen de waarden  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, *noch een verandering* tussen opeenvolgende tijdstippen van een uur (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Met behulp van de toets van Friedman kan *geen overeenstemming* tussen het verloop van de

LDH worden aangetoond ( $C_{\text{plasma}} = 8,90$ ;  $C_{5; 0,01} = 15,1$ . De activiteit van de zes opeenvolgende tijdstippen komen goed overeen met de resultaten van de drie voorgaande series (zie grafieken 6, 14, 20 en 26).

De iso-enzymverdeling in plasma op tijdstippen  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur is bepaald bij acht katten. De waarnemingen zijn samengevat in tabel 28.

Tabel 28. Relatieve verdeling van  $\text{LDH}_{\text{iso}}$  in plasma, uitgedrukt in procenten

		$\text{LDH}_1$	$\text{LDH}_2$	$\text{LDH}_3$	$\text{LDH}_4$	$\text{LDH}_5$
$t = 0$ uur	$\bar{x}$	32,8	29,1	20,4	7,9	8,8
	SD	5,6	4,8	3,9	2,0	1,1
$t = 5$ uur	$\bar{x}$	40,4	40,0	8,9	4,7	5,6
	SD	5,1	4,2	3,5	2,6	3,0
		(S)	(S)	(S)	(S)	(S)

Gemiddelde en SD voor de  $\text{LDH}_{\text{iso}}$ -activiteit op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur, gemeten bij 8 katten. Met behulp van de symmetrietoets van Wilcoxon zijn er significante verschillen gevonden tussen de paren waarden op  $t = 0$  uur en  $t = 5$  uur (significantieniveau  $\alpha = 0,05$ )

Er is een *sterke verhoging* van de  $\text{LDH}_1$  en de  $\text{LDH}_2$ , een *sterke daling* van de  $\text{LDH}_3$  en een *iets minder*<sup>1</sup> *sterke daling* van de  $\text{LDH}_4$  en  $\text{LDH}_5$  in de relatieve verdeling. Alle verschillen zijn significant aantoonbaar.

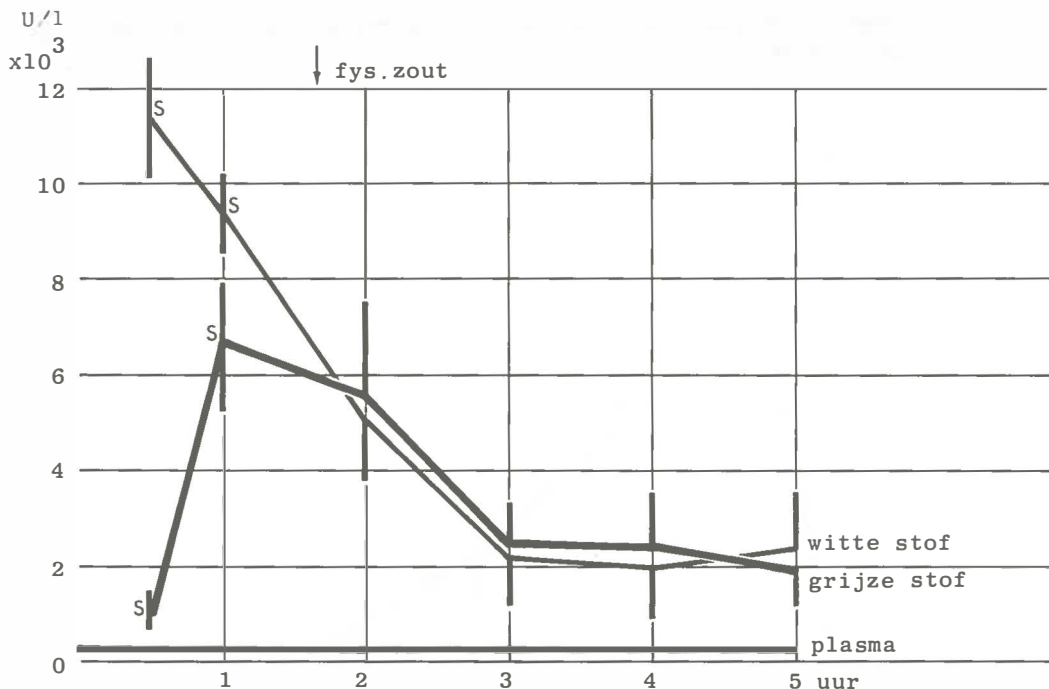
### *Oedeemvocht*

Voor alle negen naaldjes kan een *daling* in de LDH-activiteit worden aangetoond voor de eerste en de tweede periode. Gedurende de derde periode is voor *geen enkel naaldje een verandering* aantoonbaar. Dit blijkt uit de toetsingsgrootte  $K$ .

Vergelijken wij grafiek 26 met grafiek 6 van de controle serie dan valt de grote gelijkvormigheid op. Ook in deze serie treedt op  $t = 3$  uur een stabilisatie op in de activiteit rond de 2000 U/l.

In het verloop van de LDH-activiteit na  $t = 100$  min is een mogelijk effect van het isotone zout *niet meetbaar*.

De iso-enzymverdeling in oedeemvocht van witte en grijze stof vertoont *geen verschil* met de gevonden relatieve verdeling van de controle serie.



Grafiek 26. LDH-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde de SD aan.

#### 4.5.6 creatine-fosfokinase fysiologisch zout serie

##### Plasma

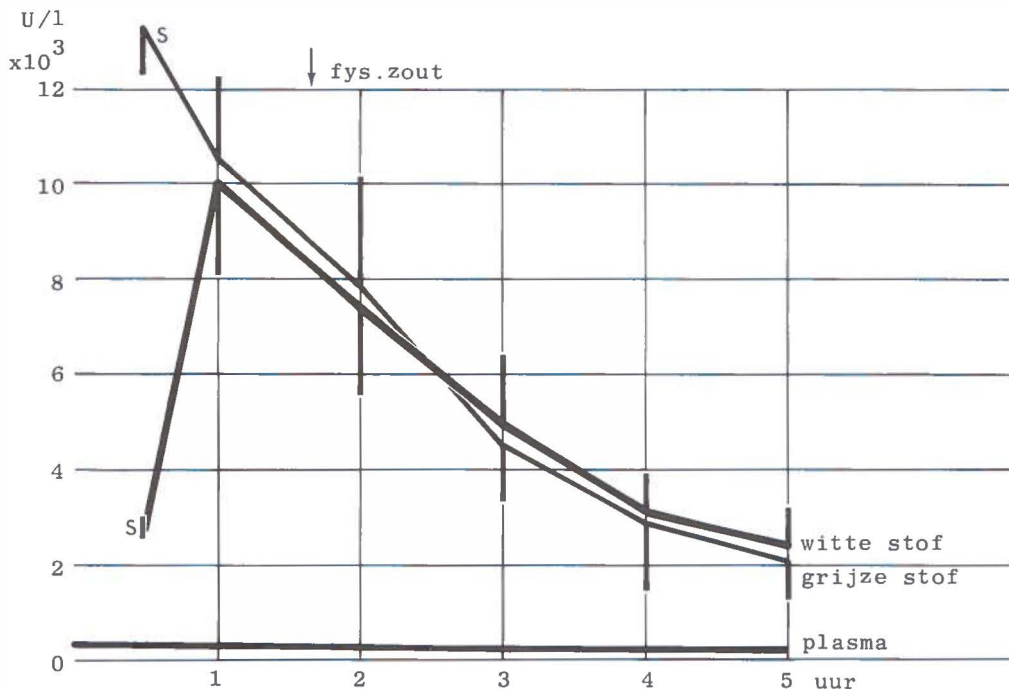
Alleen over de tijdsintervallen  $t = 0$  t/m  $t = 5$  uur en  $t = 0$  uur t/m  $t = 1$  uur is een *daling* van de CPK-activiteit aangetoond (symmetrietoets van Wilcoxon, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Er is een *zekere overeenstemming* aangetoond tussen het verloop van de CPK-activiteit van acht katten (toets van Friedman,  $C_{\text{plasma}} = 20,85$ ;  $C_{5, 0,01} = 15,1$ ).

Er treden <sup>5, 0,01</sup>geen veranderingen op in de iso-enzymverdeling na toediening van een isotone zoutoplossing. Dit blijkt uit de visuele beoordeling na elektroforetische scheiding van CPK.

##### Oedeemvocht

Alle acht naaldjes in witte en grijze stof, die vloeistof produceerden, tonen een *daling* in het verloop van de CPK-activiteit. Slechts voor naaldje 11 mm is deze daling gedurende de derde periode niet aantoonbaar.

Grafiek 27 geeft het verloop in activiteit weer van CPK in plasma en oedeemvocht.



Grafiek 27. CPK-activiteit in plasma en oedeemvocht, geïsoleerd uit witte en grijze stof. S = significant verschil voor oedeemvocht tussen de waarden van de witte en de grijze stof (Wilcoxon twee steekproeven-toets; tweezijdig niveau  $\alpha = 0,05$ ). De verticale strepen geven, gemeten vanaf het gemiddelde, de SD aan.

De iso-enzymverdeling behoudt na toediening van de isotone zoutoplossing eenzelfde verdeling als gevonden is in de voorgaande series:  $CPK_{BB} = 97 \pm 2,2\%$  en  $CPK_{MM} = 3 \pm 2,8\%$ .

#### 4.5.7 liquor fysiologisch zout serie

Van de acht proefdieren van deze serie waren slechts vier katten waaruit liquor kon worden geïsoleerd. Als blanco gelden de waarden uit tabel 21.

Het toepassen van statistische methoden voor het vergelijken van de resultaten uit deze serie met die van de andere series is niet mogelijk, vanwege het lage aantal monsters van serie IV. Toch geven de waarden in tabel 29 enig inzicht in de mate van verandering der zes parameters na koude laesie.

Tabel 29. Waarden van de zes variabelen in liquor

	blanco (N = 22)			serie IV (N = 4)		
natrium	159,2	+	5,1	148,8	+	6,0
kalium	3,34	+	0,22	3,98	+	0,45
COP	0,55	+	0,20	3,88	+	1,60
LDH	152,6	+	35,4	2287	+	1004
CPK	6,64	+	2,15	1674	+	878
<sup>99m</sup> Tc-albumine	0			10,5	+	3,9

Natrium en kalium uitgedrukt in mM, COP in mmHg, LDH en CPK in U/l en <sup>99m</sup>Tc-albumine in % plasma-activiteit op het tijdstip van liquorafname (= 5 uur na koude laesie); + SD

De veranderingen gedurende het gehele experiment van de zes parameters in plasma en oedeemvocht van deze serie stemmen geheel overeen met die van de controle serie.

De elektrolytenconcentratie, enzymenactiviteit, COP en  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit vertonen geen enkele meetbare verandering na intracerebrale injectie van het isotone zout, die kan worden toegeschreven aan deze toediening.

De monsters uit de witte stof worden gekarakteriseerd door een onmiddellijk hoge beginwaarde voor de kaliumconcentratie en enzymenactiviteit ten gevolge van de cellulaire beschadiging en voor COP en  $^{99m}\text{Tc}$ -albumine-activiteit ten gevolge van de BBB-beschadiging. In de grijze stof treedt in de beginfase van het experiment vanuit lage beginwaarden een stijging op voor de enzymenactiviteit, COP en de radio-activiteit, totdat het de waarden van het oedeemvocht van de witte stof heeft bereikt. Dit verschijnsel is het gevolg van de remmende invloed, die oedeemvocht in de grijze stof ondervindt. In tegenstelling tot de grijze stof schijnt de "opgeblazen" witte stof de bulk flow van het oedeemvocht - en dus in het bijzonder hoogmoleculaire stoffen - niet te hinderen. In de discussie van de controle serie is dit verschijnsel uitvoerig behandeld.

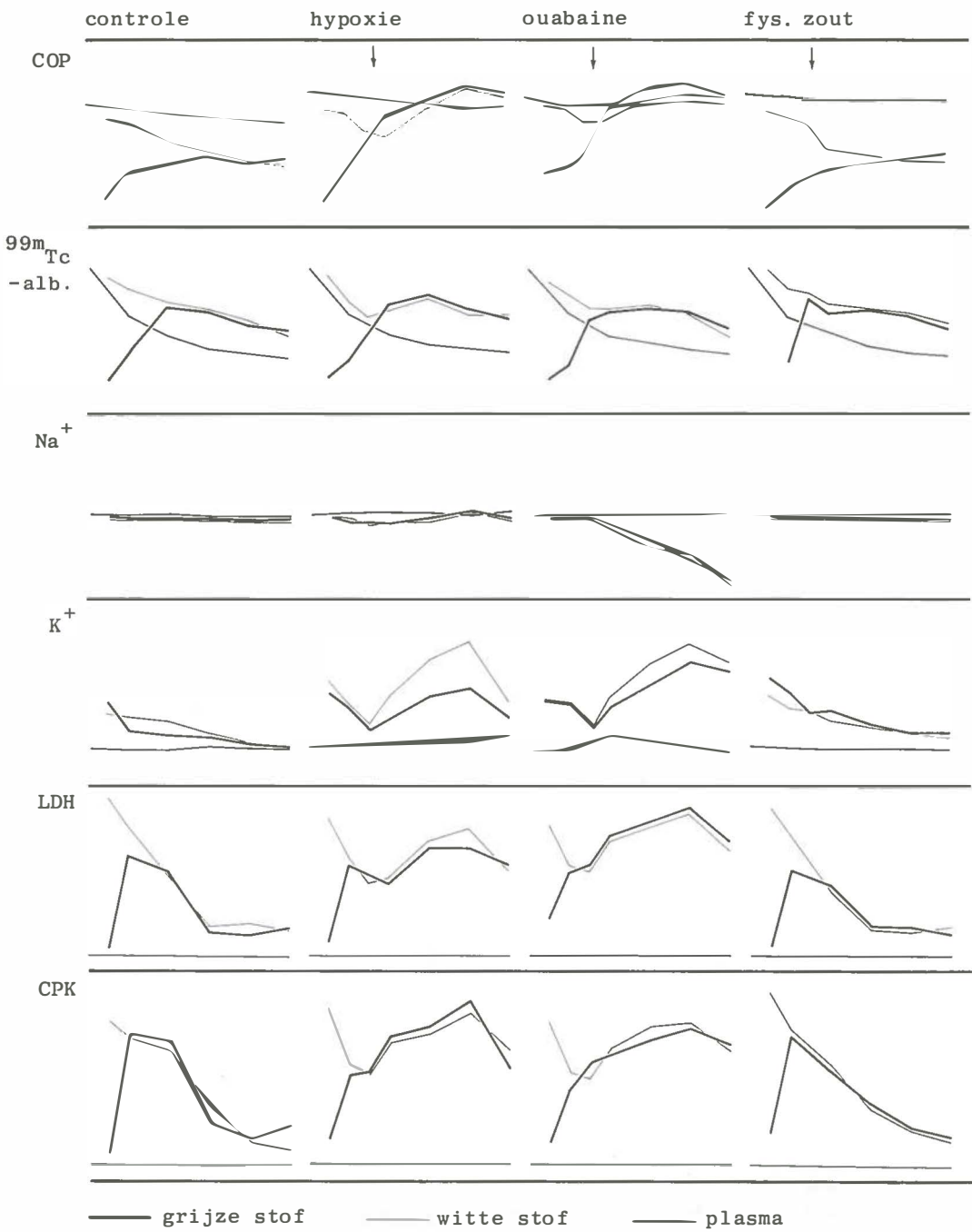
Slechts de natriumconcentratie in oedeemvocht van grijze en witte stof verschilt gedurende het gehele experiment niet significant van de plasmawaarden. Deze serie was bedoeld als de controle van de ouabaine serie. Uit de resultaten van beide series volgt dat na een aanvankelijk overeenkomstig verloop van de gemeten parameters tot de toediening van ouabaine of isotoon zout, er grote verschillen optreden in de elektrolytconcentraties, enzymactiviteit, COP en de radio-activiteit. Zoals verwacht treden er nauwelijks verschillen op in de indikkingsfactor bij de ouabaine serie vergeleken met de controle -en fysiologisch zout serie.

	indikkingsfactor	
	fysiologisch zout	controle serie
COP	1,9 x	1,9 x
$^{99m}\text{Tc}$ -alb.	1,0 x	1,1 x
LDH	5,5 x	5,5 x
CPK	5,5 x	5,5 x

Ook hier geldt, evenals in de conclusie van de hypoxie serie dat een vervijfvoudiging van de LDH of CPK-activiteit geen invloed op de COP indikkingsfactor behoeft te hebben, indien de oorspronkelijke hoeveelheid enzymmoleculen, die deelnemen aan de vorming van de COP, zeer laag is.



# 4.6 het onderlinge verband tussen de series I t/m IV



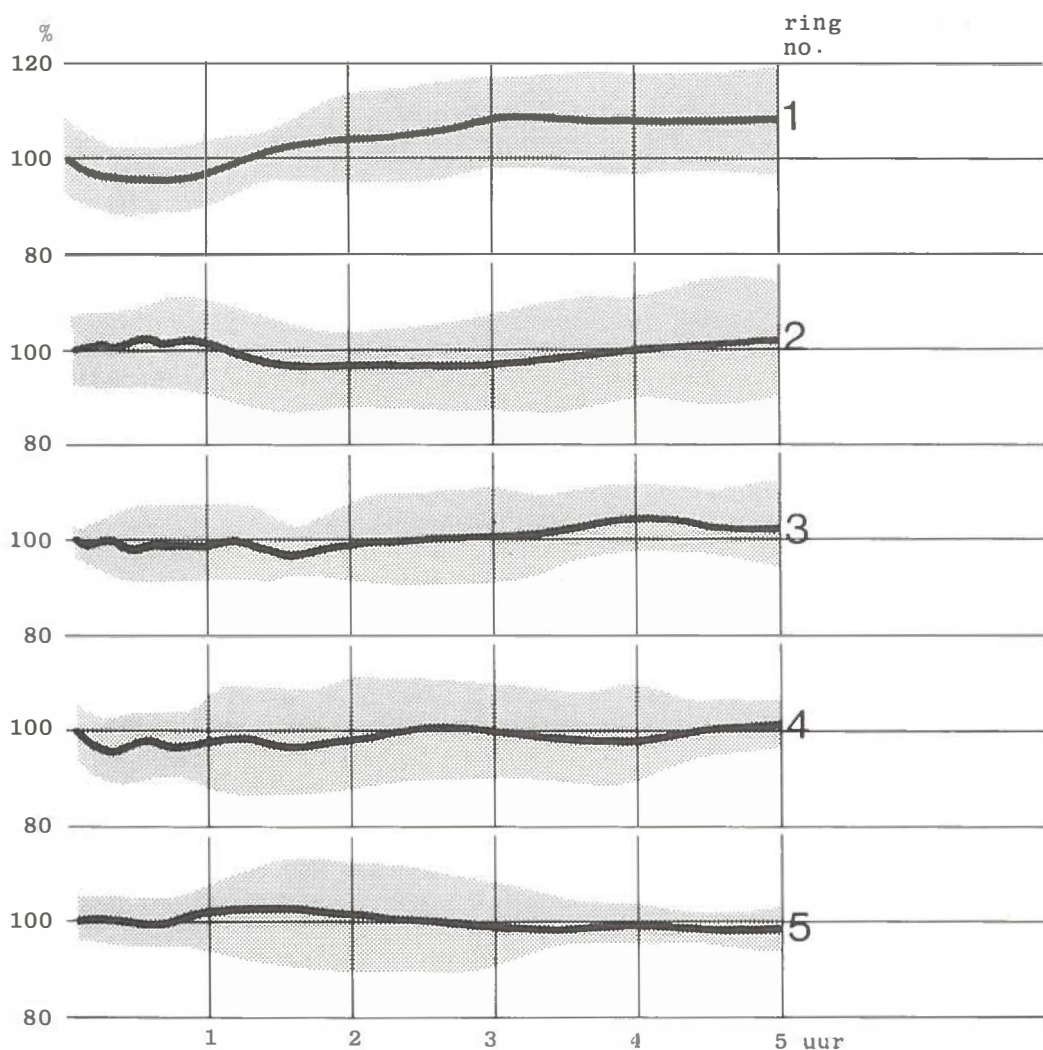
## 4.7 impedantiemetingen

### 4.7.1 inleiding

Het doel van de impedantiemetingen is het verkrijgen van meer inzicht in de uitbreidingssnelheid van het oedeemvocht en de relatieve ECS-veranderingen in het hersenweefsel onder verschillende omstandigheden. De impedantie is gemeten in weefsel zonder het toebrengen van een koude laesie (serie V). Voorts is de meting uitgevoerd in oedemateus weefsel vóór en tijdens hypoxie (serie VI resp. VII), na intracerebrale injectie van ouabaine (serie VIII) of isotone zoutoplossing (serie IX). Na het opzetten van het experiment volgens de procedure, beschreven in 3.2 werd binnen 90 sec na het beeindigen van de koeling (met uitzondering van serie V "blanco") de impedantie-elektrode (= meetelektrode) samen met de referentie elektrode stereotactisch in het hersenweefsel gestoken en wel zodanig dat alle vijf ringetjes in de witte stof terecht kwamen. Tussen de vierde en de vijfde minuut na het toebrengen van een koude laesie werd de weefselweerstand, behorend bij ieder ringetje, gemeten. Het gemiddelde van de eerste drie waarnemingen van de weerstand bij ieder ringetje is de beginwaarde of blanco van ieder ringetje. De hierop volgende metingen werden uitgedrukt in procenten van de blancowaarde (laatstgenoemde is gesteld op 100%). Tot  $t = 40$  min werd iedere 5 min, tot  $t = 200$  min werd iedere 10 min en tot  $t = 300$  min werd iedere 20 min de weefselweerstand - behorend bij ieder ringetje - gemeten.

### 4.7.2 serie V "blanco"

Bij zes proefdieren, behandeld zoals beschreven in 3.2, maar zonder dat een koude laesie werd toegebracht, werd op bovenbeschreven wijze de impedantie van het hersenweefsel bepaald. Grafiek 28 geeft het verloop weer voor de vijf ringetjes (zie ook figuur 12) op de in 3.3.6 aangegeven diepte in het weefsel. Uit de grafiek blijkt, dat er *geen noemenswaardige verandering van de impedantie* optreedt tijdens de vijf uur durende experimenten. De grootste verandering is gemeten bij ringetje 1 op  $t = 190$  min en wel  $9,5 \pm 8,4\%$  van de blancowaarde. De ringetjes 2 t/m 5 vertonen voor de bijbehorende gemiddelde impedanties zeer kleine fluctuaties, die binnen een afwijking van 5% liggen. Tijdens de vijf uur durende experimenten schijnt onvoldoende oedeemvorming ten gevolge van de twee steekwonden te zijn opgetreden om meetbare impedantieverandering te geven. Dit vergemakkelijkt evenwel de beoordeling van de resultaten bij andere series, omdat er geen correcties behoeven te worden uitgevoerd.



Grafiek 28. Het verloop van het gemiddelde van de impedantie in het hersenweefsel van zes proefdieren. Het gemiddelde van de weerstanden van de eerste drie metingen per ringetje en per kat is gesteld op 100 %. De overige waarden worden per ringetje en per kat berekend als percentage van dit gemiddelde. Het donkere gebied geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval aan van het gemiddelde percentage.

Voor deze controleserie werden zes katten behandeld, zoals beschreven in 3.2 en dus mét een koude laesie. Grafiek 29 geeft het verloop weer van de impedantie in het hersenweefsel.

Uit deze grafiek valt af te leiden dat een vasogeen hersenoedeem een *grote verandering in impedantie* veroorzaakt. De eerste pijl geeft het tijdstip aan, waarop de bovenste significantiegrens onder de grens van 100% duikt. Deze significante daling moet het gevolg zijn van de oedeemvorming. Het moment van eerste significante daling geeft een idee omtrent en wanneer men bij een ringetje invloed van het oedeem mag verwachten. Afhankelijk van het ringetje in het weefsel zal deze significante daling dan pas zichtbaar worden, wanneer het oedeemvocht in zijn proces van uitbreiding het betreffende ringetje heeft bereikt en in het weefsel tussen de beide elektroden het vochtgehalte, de elektrolytconcentratie en de ECS verandert.

De passage van het vloeistoffront voor ieder ringetje wordt verondersteld plaats te vinden op het gemiddelde tijdstip voor verschillende katten, aangegeven door pijl 1.

Daarna zal de impedantie verder dalen totdat er een evenwicht is bereikt in vochtgehalte, elektrolyten en ECS. Dit tijdstip is aangegeven met pijl 2. Dit is ongeveer het gemiddelde moment voor verschillende katten dat de impedantie de laagste waarde bereikt. De uitbreidingssnelheid van het oedeemvocht kan grafisch worden weergegeven door de tijdstippen, behorend bij de pijlen 1 en 2 uit te zetten tegen de diepte - in mm uitgedrukt - van de vijf ringetjes (zie 4.7.7). De uitbreidingssnelheid van het oedeemvocht gedurende het eerste uur na koude laesie is nagenoeg constant tot een diepte van 9 mm; daarna neemt de uitbreidingssnelheid af.

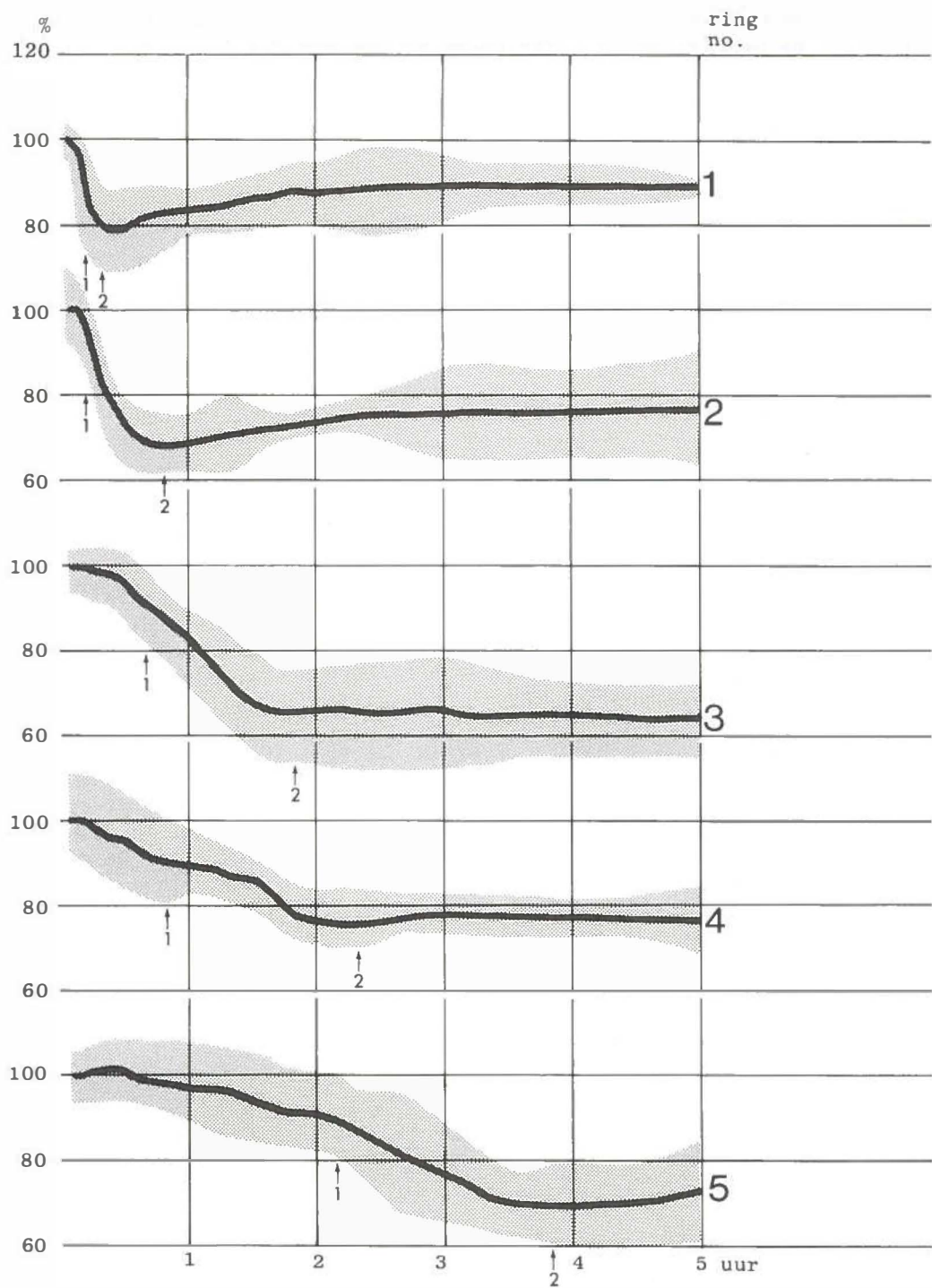
Hiervoor kunnen een aantal factoren verantwoordelijk zijn. Wanneer, na een zekere inlooperperiode, de snelheid van toename van oedeemvocht constant is, bijv.  $a$  mm/sec, en het vocht zou zich bolvormig uitbreiden, dan zal de straal  $r(t)$  van het oedematische gebied aangroeien met

$$\frac{a}{2\pi\{r(t)\}^2} \text{ mm/sec, omdat immers het oppervlak van een halve bol met straal } r(t) \text{ gelijk is aan } 2\pi\{r(t)\}^2.$$

$$\text{Maar als } \frac{dr(t)}{dt} = \frac{a}{2\pi\{r(t)\}^2}, \text{ dan is } r(t) = \sqrt[3]{\frac{3a}{2} \cdot t}.$$

Grafiek 29. Het verloop van het gemiddelde van de impedantie in het hersenweefsel van zes proefdieren. Het gemiddelde van de weerstanden van de eerste drie metingen per ringetje en per kat is gesteld op 100 %. De overige waarden worden per ringetje en per kat berekend als percentage van dit gemiddelde. Het donkere gebied geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval aan van het gemiddelde percentage.

Pijl 1 geeft de eerste significante daling aan t.o.v. de beginwaarde; pijl 2 geeft de laagste impedantiewaarde aan, die volgt op de eerste significante daling.



Doordat het oedeemvocht zich in de witte stof gemakkelijker in de vezelrichting lijkt voort te bewegen dan loodrecht daarop en de bron van het exsudaat niet puntvormig is maar een vlak met een doorsnede van 13 mm, is bovenstaande theorie slechts een grove benadering van de werkelijkheid.

#### 4.7.4 serie VII "hypoxie"

Zes proefdieren werden behandeld als beschreven in 3.2 met een koude laesie. De impedantiemetingen werden uitgevoerd als beschreven in 4.7.3 tot  $t = 170$  min. Op dit tijdstip werd een hypoxie geïnduceerd op dezelfde wijze als beschreven is in 4.3 (serie II). In grafiek 30 is het verloop weergegeven van de impedantie in hersenweefsel vóór en tijdens de hypoxie. De pijlen 1 en 2 geven wederom het tijdstip van significante daling resp. laagste impedantiewaarde aan. Van ring 5 is het tijdstip, waarop de laagste impedantie werd bereikt, van geen der proefdieren bekend, omdat de hypoxie vóór dit tijdstip werd geïnduceerd. Het gemiddelde tijdstip behorend bij pijl 2 is dus niet bekend.

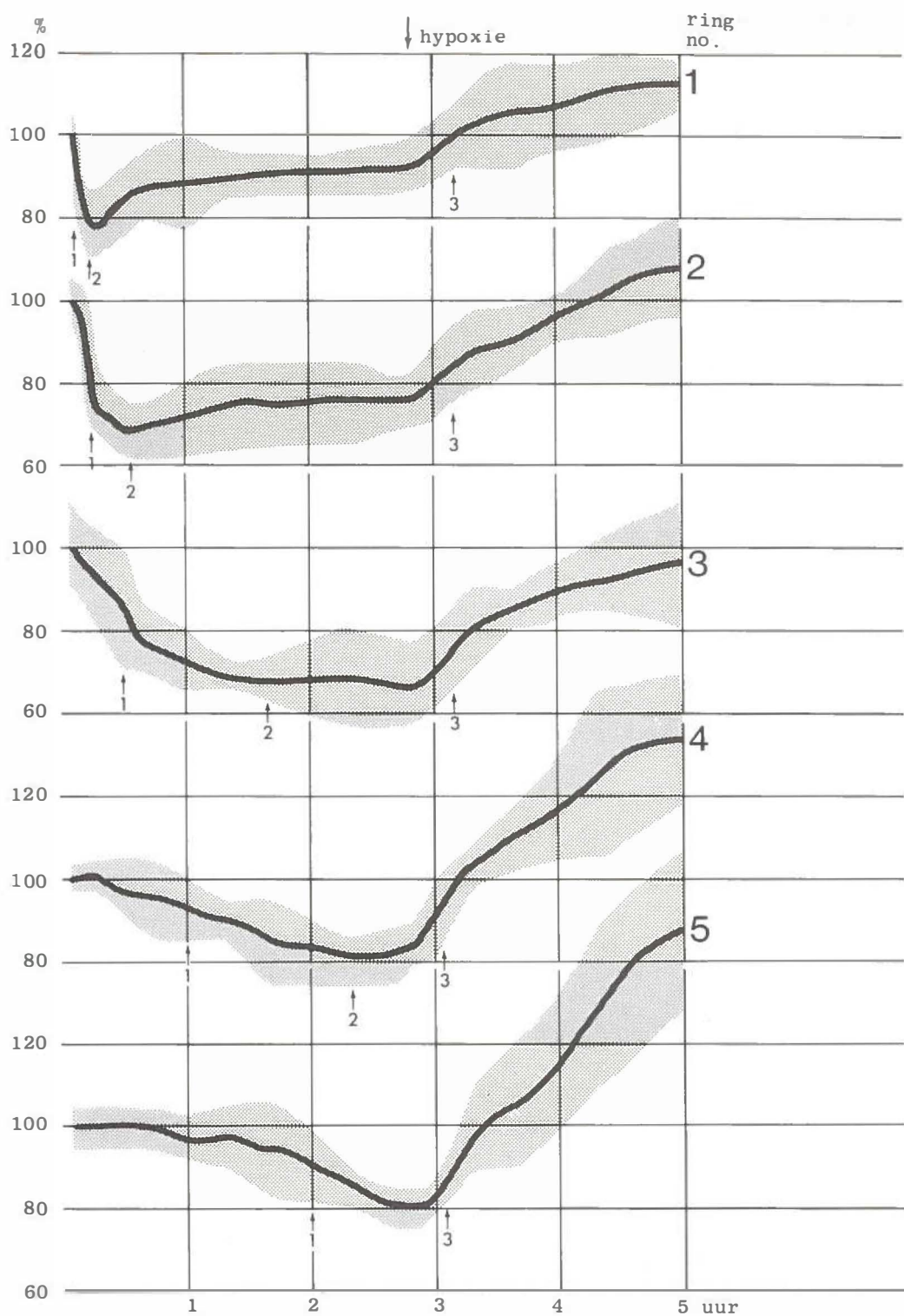
Voor de inductie van de hypoxie gedraagt de impedantie in deze serie zich overeenkomstig de resultaten van serie VI "normaal". Na de inductie *stijgt de impedantie snel* (symmetrietoets van Wilcoxon; significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Dit wijst op een verkleining van de ECS en een zwelling van de cellen. De tijdstippen behorend bij de pijlen 1 en 2 zijn weergegeven in tabel 30 en grafiek 33 (zie 4.7.7). De ondergrens van het 95% van betrouwbaarheidsinterval stijgt op tijdstip 3 (pijl 3) boven de laatstgemeten impedantie van vóór de hypoxie. Deze significante stijging treedt 12 - 20 min na inductie van de hypoxie op in de vijf ringetjes. Daarnaast lijkt de stijging van de impedantie in de ringetjes 4 en 5 sterker dan voor de overige ringetjes (zie grafiek 30). Met uitzondering van de resultaten van ringetje 3 blijkt in het weefsel rondom de ringetjes een ECS te ontstaan, die kleiner is dan de blanco-waarde op  $t = 5$  min.

Grafiek 30. Het verloop van het gemiddelde van de impedantie in het hersenweefsel van zes proefdieren. Het gemiddelde van de weerstanden van de eerste drie metingen per ringetje en per kat is gesteld op 100 %. De overige waarden worden per ringetje en per kat berekend als percentage van dit gemiddelde. Het donkere gebied geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval aan van het gemiddelde percentage.

Pijl 1 geeft de eerste significante daling aan t.o.v. de beginwaarde; pijl 2 geeft de laagste impedantiewaarde aan, die volgt op de eerste significante daling;

pijl 3 geeft het tijdstip aan van significante stijging t.o.v. de impedantie van vóór de hypoxie.





Om de invloed van ouabaine op het oedemateuze hersenweefsel te bestuderen werd te werk gegaan als in 4.7.4 met dien verstande dat in plaats van een hypoxie op  $t = 170$  min ouabaine werd toegediend. Op dit tijdstip werd een  $0,025$  ml  $0,9\%$  oplossing van isotoon zout met ouabaine ( $3 \times 10^{-4} M$ ) intracerebraal ter hoogte van ringetje 3 ingespoten. Grafiek 31 geeft een samenvatting van het verloop van de impedantie tijdens de vijf uur durende experimenten met zes proefdieren. Het moment van daling en het bereiken van de laagste impedantiewaarden zijn weergegeven door middel van de pijlen 1 resp. 2.

Vóór de toediening van de ouabaine verloopt de impedantie overeenkomstig de resultaten van serie VI en VII (zie tabel 30 en grafiek 33). De ouabaine verspreidt zich in het hersenweefsel ter hoogte van ringetje 3. Het effect van deze stof is het eerst merkbaar aan de *significante stijging van de impedantie* van het weefsel rondom ringetje 3 namelijk 10 min na toediening van de ouabaine-oplossing.

Vervolgens is er een significante impedantiestijging meetbaar in het weefsel rondom de ringetjes 2 en 4 (32 resp. 25 min na toediening van ouabaine) en de ringetjes 1 en 5 (46 resp. 42 min na toediening van de ouabaine). Ook de ringetjes 4 en 5 van deze serie vertonen een zeer sterke impedantiestijging voor het omliggende weefsel (Wilcoxon symmetrietoets, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). Met uitzondering van de resultaten van ringetje 3 wordt in deze serie - evenals in serie VII het geval is - een ECS gevonden, die kleiner is dan de blancowaarde.

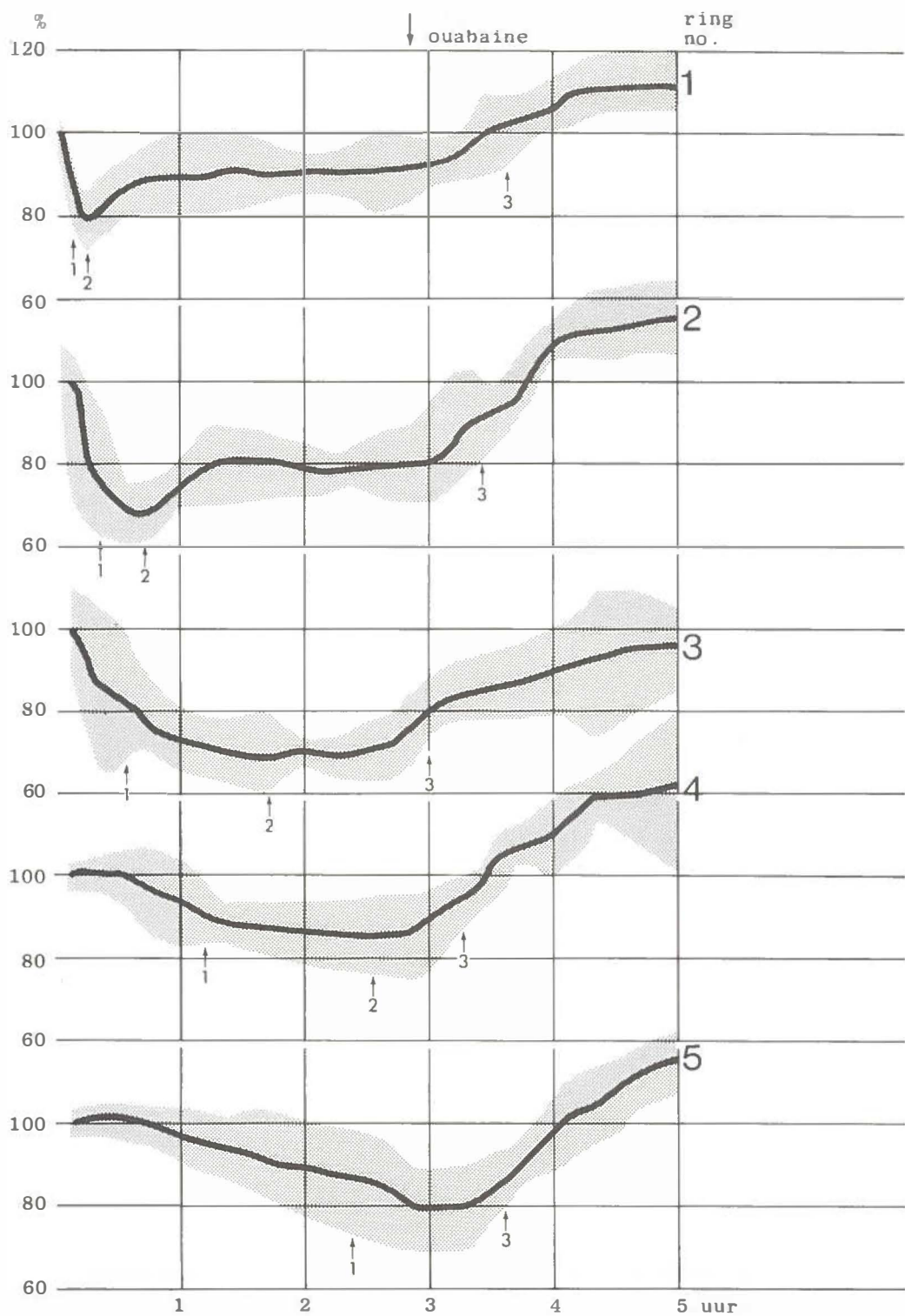
Grafiek 31. Het verloop van het gemiddelde van de impedantie in het hersenweefsel van zes proefdieren. Het gemiddelde van de weerstanden van de eerste drie metingen per ringetje en per kat is gesteld op 100 %. De overige waarden worden per ringetje en per kat berekend als percentage van dit gemiddelde. Het donkere gebied geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval aan van het gemiddelde percentage.

Pijl 1 geeft de eerste significante daling aan t.o.v. de beginwaarde;

pijl 2 geeft de laagste impedantiewaarde aan, die volgt op de eerste significante daling;

pijl 3 geeft het tijdstip aan van significante stijging t.o.v. de impedantie van vóór de toediening van de ouabaine.





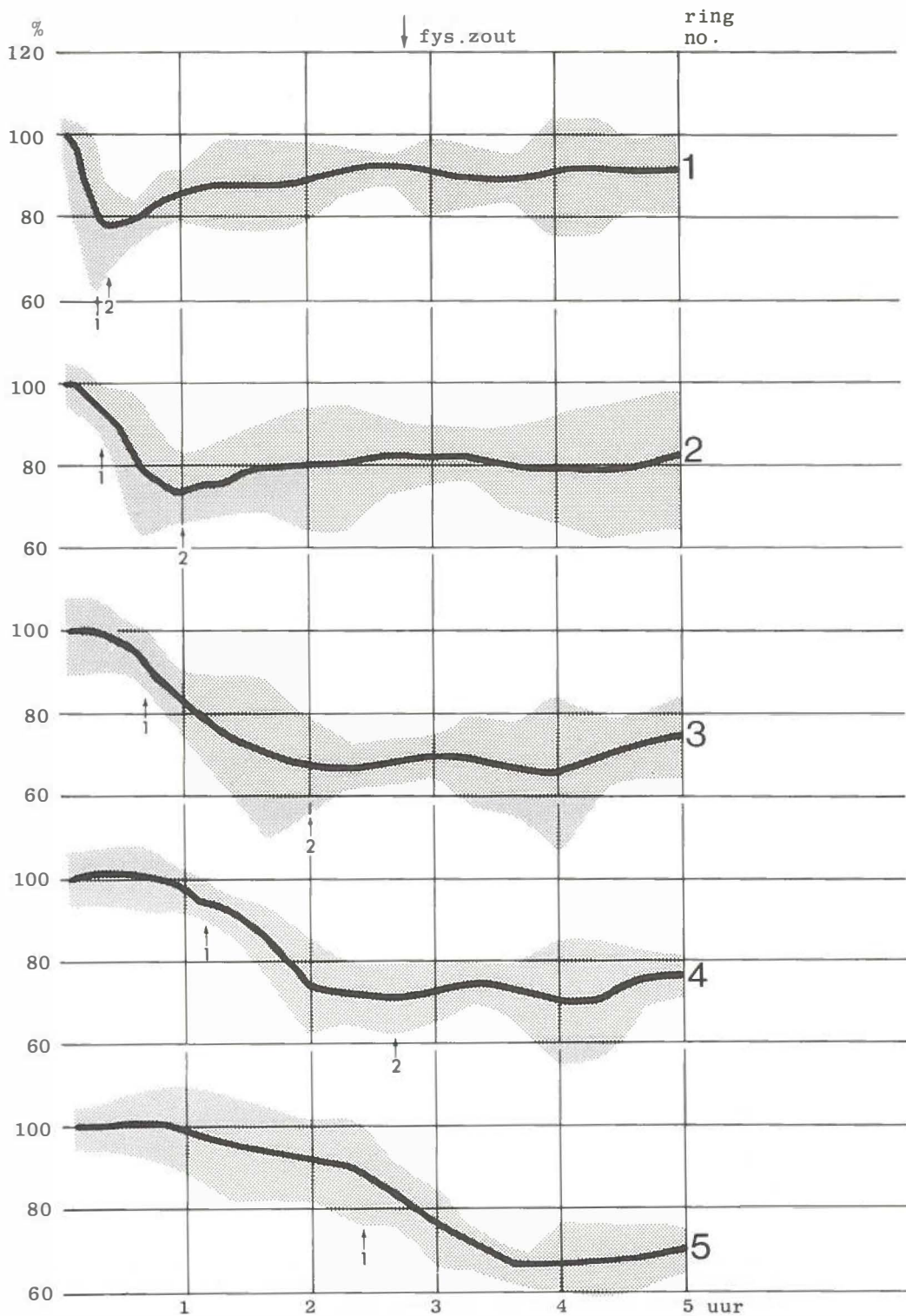
## 4.7.6 serie IX "fysiologisch zout"

Als controleserie voor de proeven met ouabaine (serie VIII) werd de proef, beschreven in 4.7.5 met 6 andere proefdieren herhaald en wel met dien verstande, dat de isotone zoutoplossing, zonder de ouabaine (0,025 ml) op  $t = 170$  min werd toegediend. Het verloop van de impedantie in hersenweefsel vóór en ná toediening van de isotone zoutoplossing is weergegeven in grafiek 32.

De significante daling (pijl 1) en de laagste impedantiewaarden (pijl 2) zijn weergegeven in tabel 30 en grafiek 33. Omdat de laatste impedantiewaarden voor ringetje 5 niet werden bereikt, is van geen der proefdieren het tijdstip, behorend bij pijl 2 bekend. Het verloop van de impedantie en de resultaten van pijlen 1 en 2 stemmen overeen met die van de voorgaande series VI t/m VIII, althans tot  $t = 170$  min. *Voor geen van de vijf ringetjes is echte: een significante impedantiestijging gevonden na toediening van de isotone zoutoplossing* (Wilcoxon symmetrietoets, significantieniveau  $\alpha = 0,05$ ). De metingen op  $t = 5$  uur laten zien, dat de impedantie varieert van  $71,5 \pm 5,0\%$  voor ringetje 5 tot  $90,0 \pm 9,8\%$  voor ringetje 1. Dit wijst erop, dat de ECS in geen enkel geval kleiner wordt dan de beginwaarden op  $t = 5$  min, zoals dat wel het geval was in de series "hypoxie" en "ouabaine".

Grafiek 32. Het verloop van het gemiddelde van de impedantie in het hersenweefsel van zes proefdieren. Het gemiddelde van de weerstanden van de eerste drie metingen per ringetje en per kat is gesteld op 100 %. De overige waarden worden per ringetje en per kat berekend als percentage van dit gemiddelde. Het donkere gebied geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval aan van het gemiddelde percentage.

Pijl 1 geeft de eerst significante daling aan t.o.v. de beginwaarde; pijl 2 geeft de laagste impedantiewaarde aan, die volgt op de eerste significante daling.



#### 4.7.7 het onderlinge verband tussen de series V t/m IX

Wil men de resultaten van de impedantieproeven onderling vergelijken, dan kan gelet worden op de tijdstippen van significante daling (pijl 1) en laagste impedantiewaarden (pijl 2), maar tevens op de grootte van de relatieve verandering ten opzichte van de blancowaarden. In onderstaande tabel is een samenvatting gegeven van de resultaten der series VI t/m IX.

Tabel 30.

ring	pijl 1				pijl 2				pijl 3	
	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VII	VIII
1	12,5(90)	10(88)	10(90)	18(81)	20(78)	15(77)	15(79)	25(79)	20	46
2	15 (92)	15(85)	20(78)	20(90)	50(68)	35(68)	40(68)	60(74)	20	32
3	40 (91)	30(87)	32(80)	40(89)	110(66)	100(67)	100(68)	120(68)	20	10
4	50 (90)	60(91)	70(90)	70(93)	140(75)	140(81)	150(85)	160(71)	15	25
5	130 (89)	120(90)	140(89)	145(90)	230(70)			(220)	12	42

Pijl 1: moment van significante verandering ten opzichte van blancowaarde (op  $t = 5$  min)

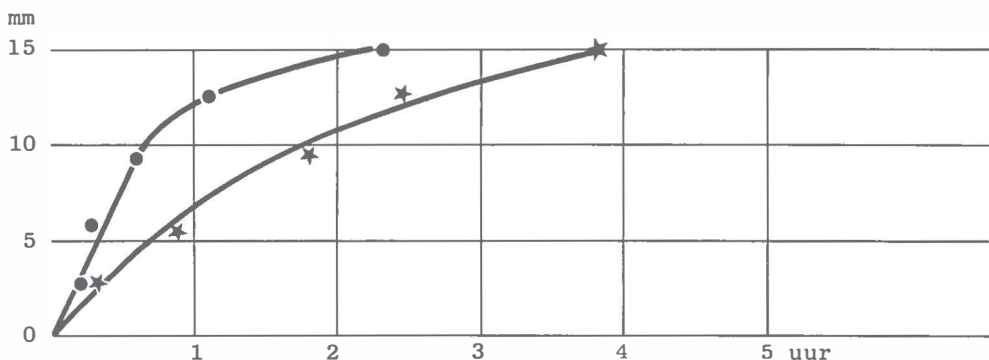
Pijl 2: moment van laagste impedantiewaarde

Pijl 3: moment van significante stijging der impedantië na  $t = 170$  min.

Waarden uitgedrukt in minuten; de waarden tussen de haakjes geven de relatieve impedanties weer van de blancowaarde, uitgedrukt in procenten

In tabel 30 is de laagste impedantiewaarde van serie IX tussen haakjes medegedeeld. Indien de toediening van de isotone zoutoplossing geen invloed heeft op de impedantie - en gezien de resultaten lijkt dit aannemelijk - dan zou het laagste impedantiewaarden op  $t = 220$  min (ofwel 50 min na toediening van het isotone zout) bereikt worden.

Er blijkt een grote overeenkomst te zijn tussen de waarden van de vier series, wat betreft het moment van daling en tijdstip waarop de laagste impedantie wordt bereikt. Deze conclusie geldt eveneens voor de mate van impedantieverandering ten opzichte van de blancowaarde. In onderstaande grafiek zijn de gemiddelde waarden van de vijf ringetjes uitgezet.



Grafiek 33. De voortplanting van het vloeistoffront van oedeemvocht (●) en de instelling van een evenwicht van het oedeemvocht (✱), gemeten op vijf verschillende diepten in het hersenweefsel.

In 4.7.3 van serie VI "normaal" is reeds kort ingegaan op het lineaire verloop van de impedantie gedurende de eerste veertig min na de koude laesie tot een diepte van ongeveer 9 mm in het hersenweefsel. Na de passage van het vloeistoffront stelt zich een evenwicht in dat wordt bereikt op het moment, dat de impedantie niet verder daalt. Op dit tijdstip mag worden verondersteld, dat de hoeveelheid oedeemvocht, elektrolytgehalte en de vergrote ECS niet of nauwelijks meer verandert. De afstand van de gelaedeerde cortex tot de ventrikelruimte bedraagt 12 - 13 mm. Volgens grafiek 33 zou het vloeistoffront deze ruimte 50 na 60 min na de koude laesie bereiken, terwijl het weefsel, grenzend aan de ventrikelruimte 125 - 145 min na de koude laesie doordrongen is met oedeemvocht. Dit stemt redelijk overeen met de experimenten van Maas (1977), die ongeveer 75 min na toediening van een koude laesie een stijging van enzymactiviteit meet in de liquor bij katten.

# samenvatting

*Hersenoedeem wordt gedefinieerd als een abnormale toename van het vochtgehalte in het hersenweefsel hetgeen resulteert in een toename van het weefselvolume.*

Omtrent de pathogenese bestaan nog vele problemen. Daarenboven bestaat soms enige verwarring, doordat de eigenschappen van het pathologische proces en de klinische symptomen, die eraan worden toegeschreven, onder één noemer worden geplaatst. De klassificatie in vasogeen, cytotoxisch en osmotisch oedeem heeft tot op zekere hoogte bijgedragen tot de standaardisering en verheldering van deze problematiek.

Dit onderzoek is gebaseerd op het isoleren van oedeemvocht voor nadere analyse van de samenstelling en voor het oplossen van een aantal problemen, die voortvloeien uit een vasogeen hersenoedeem. Bovendien is getracht een beter inzicht te krijgen in de resorptiemogelijkheden onder verschillende omstandigheden. Tevens is met behulp van impedantiemetingen de uitbreidingssnelheid van het oedeem bestudeerd.

In hoofdstuk I wordt een algemene beschouwing gegeven van de hersenen, waarbij aan enkele aspecten - belangrijk voor dit onderzoek - uitgebreide aandacht wordt geschonken. Naast een overzicht betreffende de ruimtelijke indeling in de schedel en de drie typen barrières in de hersenen wordt dieper ingegaan op de vloeistofsamenstelling van de ECF, CSF en ICF. De eigenschappen en de hoeveelheden van hersenwater, elektrolyten en eiwitten zijn in hersenonderzoek van belang voor een beter begrip van de mogelijke oorzaken van hersenoedeem, de samenstelling van het oedeemvocht en de resorptiemogelijkheden voor het oplossen van deze vloeistof.

Hoofdstuk 2 behandelt de kenmerken van de drie typen oedeem, zoals ze zijn beschreven in de literatuur. De voornoemde klassificatie op basis van de pathogenese, voorgesteld door Klatzo (1967) en Go (1970) is algemeen aanvaard. In hoofdstuk 2 ligt de nadruk op het vasogene type, omdat wij ons in het onderzoek bediend hebben van een experimenteel model, waarin dit vasogene hersenoedeem reproduceerbaar kan worden opgewekt. Naast morfologische aspecten en chemische veranderingen wordt aandacht geschonken aan het herstel en de resolutie van het oedeem.

In Hoofdstuk 3 wordt behalve de methode voor het opwekken van een vasogeen hersenoedeem in kattehersen door middel van koeling ( $-30^{\circ}\text{C}$ ) volgens de methode van Klatzo ook de isolatieprocedure van oedeemvocht beschreven. Op deze vochtmonsters, op plasma en op liquor zijn de volgende bepalingen uitgevoerd: colloïdosmotische druk (de COP is een maat voor het eiwitgehalte) als uitdrukking van een veranderde BBB-permeabiliteit en van een mogelijk cellulaire beschadiging; elektrolytgehalte (natrium en kalium) als maat voor een veranderde BBB-permeabiliteit en cellulaire beschadiging; LDH- en CPK-activiteit (zowel totaal als iso-enzym) als maat voor een cellulaire beschadiging en voor een uitvloed van hersenspecifieke enzymen naar de bloedbaan; de activiteit van intraveneus toegediende  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albumine als maat voor de beschadiging van de BBB.

Naast de isolatieproeven is met een speciaal ontworpen elektrode op verschillende diepten in het hersenweefsel de impedantie gemeten. Op deze wijze kan enig inzicht worden verkregen in de voortplantingssnelheid van het oedeemvocht, de instelling van een vloeistofevenwicht alsmede in de relatieve verdeling van de ECS en ICS. De isolatieprocedure en impedantie-metingen zijn uitgevoerd onder zogenaamde "normale" omstandigheden, na inductie van een hypoxie en na intracerebral injecteren van ouabaine of isotone zoutoplossing. Daar het niet mogelijk is gebleken met deze isolatieprocedure ECF te verkrijgen (dit is zonder het toebrengen van een koude laesie) hebben wij de samenstelling van het oedeemvocht vergeleken met de CSF, omdat de samenstelling van de CSF en ECF nagenoeg identiek wordt beschouwd. Oedeemvocht is van vasogene oorsprong; daarom zijn bovengenoemde bepalingen ook op plasma uitgevoerd. Hoofdstuk 4 geeft de resultaten weer van de experimenten en kunnen als volgt worden samengevat.

Het natriumgehalte in oedeemvocht benadert de plasmawaarden, hetgeen wijst op de vasogene oorsprong van het vocht. De hoge beginwaarden van het kaliumgehalte is het gevolg van cellulaire beschadiging door de koude laesie. De continue daling tot het niveau van het kaliumgehalte in plasma wordt veroorzaakt door de verdunning van het oedeemvocht tijdens de uitbreiding in het weefsel of door de opname door gliacellen, die geactiveerd worden door een verhoogd kaliumgehalte in de ECF. De ( $\text{Na}^+$ ) en ( $\text{K}^+$ ) in liquor is sterk verlaagd resp. verhoogd ten opzichte van de blancowaarden ten gevolge van een vermenging van oedeemvocht met liquor.

De cellulaire beschadiging is eveneens duidelijk merkbaar aan de uitzonderlijk hoge LDH- en CPK-activiteiten in het oedeemvocht, vooral in de eerste monsters, verkregen uit de witte stof. De CPK-activiteit bestaat voor 96% uit het hersenspecifiek CPK<sub>BB</sub>-iso-enzym; de LDH iso-enzymen in oedeemvocht tonen eveneens een hersenspecifiek verdelingspatroon. De lage begin-activiteit van de enzymen en de sterke stijging ervan gedurende het begin van de experimenten wijzen op een remmende invloed op de uitbreidingssnelheid van het oedeemvocht in de onbescha-



digde grijze stof. Hierop zal later nader worden ingegaan. Tijdens de uitbreiding van het oedeem komen LDH en CPK in de liquor terecht; dit blijkt uit de activiteitsstijging van deze enzymen. Ook de veranderde LDH-iso-enzymverdeling en het verschijnen van CPK<sub>BB</sub> in plasma zijn het gevolg van oedeem. Naast LDH en CPK als parameters voor cellulaire beschadiging zijn de COP en <sup>99m</sup>Tc-albumine in het oedeemvocht de parameters voor de BBB-beschadiging. Een BBB-beschadiging door een koude laesie veroorzaakt een verhoogde COP en het verschijnen van het gelabelde albumine - dat onder normale omstandigheden niet de BBB of BLB kan passeren - in het hersenweefsel en liquor. Evenals het geval is bij de enzymen vertonen de COP en <sup>99m</sup>Tc-albumine in oedeemvocht uit grijze stof een stijging na een lage begindruk resp. -activiteit. Na enige tijd zijn deze verschillen tussen druk of radio-activiteit in oedeemvocht uit witte en grijze stof verdwenen. Eiwitten in oedeemvocht schijnen geremd te worden in hun uitbreidingssnelheid in de onbeschadigde grijze stof. Dit is in tegenstelling tot de elektrolyten, die dit concentratieverschil voor witte en grijze stof niet vertonen. De oorzaak moet gezocht worden in de weefselstructuur: de grijze stof is gekenmerkt door een hechte netwerkstructuur, terwijl de witte stof is opgebouwd uit parrallel gerangschikte, gemakkelijk van elkaar te wijken, axonenbundels. Elektrolyten ondervinden deze hinder niet. Het duurt daarom ongeveer twee uur voordat het oedeemvocht zich homogeen over de witte en de grijze stof heeft verspreid. Tijdens de hypoxie en na toediening van ouabaine treedt een stijging op van de enzymactiviteit, de COP, <sup>99m</sup>Tc-albumine-activiteit en het kaliumgehalte in het oedeemvocht. De stijging van de enzymenactiviteit is echter onevenredig groot ten opzichte van de stijging van de COP en <sup>99m</sup>Tc-albumine-activiteit, wijzend op verandering van de celmembraanpermeabiliteit onder invloed van de hypoxie en de ouabaine. De stijging van het exogene gemerkte albumine in oedeemvocht maakt duidelijk, dat de oorzaak van deze veranderingen ook van een andere aard moet zijn. De toename van alle parameters (m.u.v. natrium) in het oedeemvocht is ook het gevolg van een "indikking" van de vloeistof, gepaard gaande met een verkleining van de ECS. Dit laatste punt blijkt trouwens uit de impedantiemetingen (zie onder). Hypoxie en ouabaine veroorzaken beide een celzwellen door een herverdeling van vocht over de ECS en ICS. Deze vloeistofverplaatsing kan worden verklaard door het niet optimaal functioneren van de Na-K-pomp als gevolg van een energiegebrek tijdens de hypoxie of het binden aan het cellulaire enzym Na-K-ATPase door ouabaine. Aantasting van het pompmechanisme is volgens de literatuur zichtbaar aan de daling van de ATP/ADP- en lactaat/pyruvaat-verhouding. Onder dergelijke omstandigheden zal natrium de cel binnenstromen - passief gevolgd door water en chloorionen - en kalium zal naar de ECS stromen. De stijging van het kaliumgehalte in het oedeemvocht is duidelijk aangetoond. De daling van het natriumgehalte is alleen aantoonbaar na toedie-



ning van de ouabaine. De hypoxie is waarschijnlijk hiervoor onvoldoende geweest en is de verschuiving van natrium uit de ECS evenredig met de verkleining van de ECS, zodat er geen verandering van de natriumconcentratie ontstaat.

Impedantiemetingen tonen aan dat een verkleining van de ECS plaatsvindt tijdens hypoxie of na toediening van ouabaine. De uitbreidingssnelheid van het oedeemvloeistoffront verloopt tot een diepte van 9 mm in het weefsel nagenoeg constant; daarna neemt de snelheid af.

*In het licht van de Starlingse hypothese voor transcapillaire uitwisseling is het mogelijk, dat gedurende hypoxie en na de toediening van ouabaine de COP van het oedeemvocht - die zelfs boven de plasmawaarden uitstijgt - niet alleen zorgt voor een retentie van het oedeemvocht, maar tevens voor een waterverplaatsing naar het weefsel toe hetgeen resulteert in een verergering van het oedeem.*

# summary

*Brain edema may be defined as an abnormal increase of brain water content resulting in an increase of brain tissue volume. With regard to its pathogenesis there are still many unsolved problems. Moreover, some confusion is caused by equating features of the pathogenetic process itself and the clinical symptoms, which may be attributed to that process.*

The classification into vasogenic, cytotoxic and osmotic edema has contributed to some extent to a normalization of the statement of problems.

These experiments were focused on the isolation of the edema fluid for further analysis of its composition and the verification of its origin in vasogenic edema. Moreover it was attempted to gain insight into the possibilities of resorption under different circumstances. By means of impedance measurements the rate of propagation of edema fluid was recorded.

*Chapter 1* contains general considerations on the brain, while special attention is being paid to those aspects, which are relevant to our experiments. Next to a review on the intracranial compartments and the 3 types of barriers existing within the brain, the fluid composition of the ECF, CSF and ICF is entered into. In this respect the properties and volumes of brain water, electrolytes and proteins are to be considered important for a better understanding of the causes of brain edema, the questions concerning the composition of the edema fluid and of the resorption of the fluid as well.

*Chapter 2* deals with the various features of the 3 types of brain edema as reported in the literature. The afore-mentioned classification on the basis of pathogenesis as proposed by Klatzo(1967) and modified by Go(1970) finds many supporters. In this chapter particular attention is paid to the vasogenic type, prevailing in the experimental model we used. Apart from the morphological and chemical aspects the questions concerning repair and resolution of the edema are dealt with. *In chapter 3* the method is described comprising the induction of vasogenic edema in the cat by means of a cold injury( $-30^{\circ}\text{C}$ ) as well as the procedure for the isolation of the edema fluid. Edema fluid, plasma and CSF were subjected to further analysis comprising colloid osmotic pressure (being a measure for the protein content) changes of which reflect alterations of BBB-permeability and cellular damage; electrolytes content(sodium and potassium, changes of which again represent altered BBB-permeability and cellular damage; LDH and CPK activity (both

total and as isoenzymes) indicating brain cellular damage and their eventual appearance in the blood circulation and finally  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin radio activity (previously intravenously administered) as an indicator of BBB-damage. Apart from the isolation and analysis of edema fluid, electrical impedance of brain tissue was measured at various depths by means of a specially designed electrode. This provided information on the rate of propagation of the edema fluid, the attainment of steady state of the fluid as well as the ratio between ECS and ICS. The experiments were carried out under so-called "normal conditions", under conditions of hypoxia and after the intracerebral injection of ouabain or saline. As it was not feasible to isolate normal ECF by our procedure (i.e. without cold injury) the edema fluid will be compared with the CSF considering the composition of ECF similar to that of CSF. On account of the vasogenic origin of the edema fluid, the aforementioned analyses were carried out on plasma as well.

*In chapter 4* the results of our experiments are reported. The sodium content of edema fluid showed no significant differences from that of plasma. The high initial values of potassium may be explained by the release of  $\text{K}^+$  from cellular elements damaged by the freezing injury. The subsequent decrease of  $\text{K}^+$  to the plasma level may be due to dilution with the spread of the exudate from the lesion or it may result from the uptake by glial cells, activated by the high K-content in the ECS. The  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  content in CSF are significantly altered (i.e. decreased and increased respectively) pointing to the admixture of CSF with the edema fluid. The cellular damage is also represented by the extremely high LDH and CPK activity in edema fluid, especially in the earliest available samples from the white matter. The brain specific CPK<sub>BB</sub> activity constitutes 96% of the total CPK activity of the edema fluid; the LDH isoenzymes in edema fluid showed a brain specific distribution pattern. The increase from a low initial activity of the enzymes in edema fluid from grey matter suggest delayed propagation of the fluid into the uninjured grey matter. This will be discussed later.

During the propagation of the edema fluid the increased LDH and CPK activity in the terminal CSF samples indicate an admixture of the CSF with the edema fluid. The re-distribution of LDH isoenzymes and the appearance of the CPK<sub>BB</sub> in plasma are also attributable to the vasogenic edema. Whereas the LDH and CPK constitute the parameters for the cellular damage, the COP and  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin radio activity may be considered those for the BBB breakdown.

Breakdown of the BBB by a cold-injury results in an elevation of COP and in appearance of the labeled albumin (which normally does not pass the BBB or blood-CSF barrier) in the brain tissue and the CSF. Similarly to the pattern of changes of the enzyme activity, the COP and  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin radio activity in edema fluid from grey matter show an elevation after initial low values. After some time these differences between

white and grey matter level off. The proteins in edema fluid seem to be restricted in their migration into uninjured grey matter, in contrast to the electrolytes which do not show any concentration difference between white and grey matter. Its cause must be sought in the structure of the tissue: grey matter is characterized by a dense reticular structure, whereas white matter comprises parallelly arranged, easily separable bundles of axons. The migration of electrolytes do not seem to be influenced by these features. Therefore it takes about 2 hours for the edema fluid to distribute homogeneously over the white and grey matter.

During hypoxia and after the administration of ouabain there is an elevation of enzyme activity, of COP,  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin radioactivity and the  $\text{K}^+$  content of the edema fluid. The increase of enzyme activity, however, was unproportional with respect to the rise of COP and  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin activity, pointing to changes of permeability of the cellular membranes under the influence of hypoxia or ouabain. The elevation of the content of the exogenous  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin in edema fluid, however, makes it clear, that the changes must be of another nature as well. The increase of all parameters (with the exception of sodium) in the edema fluid may be accounted for by a concentration of the edema fluid, concomitant to a reduction of the ECS.

The latter is corroborated by the impedance measurements (vide infra). Hypoxia and ouabain both cause cellular swelling by a re-distribution of the fluid between ECS and ICS. This fluid shift may be explained by deficient functioning of the Na-K-pump, resulting from a lack of energy during hypoxia or from the binding of ouabain to the cellular  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-ase}$ .

According to the literature interference with the pump mechanism is evident from a decrease of the ATP/ADP- and the lactate/pyruvate ratios. Under these circumstances  $\text{Na}^+$  will enter the cells - followed passively by water and chloride - with  $\text{K}^+$  leaving the cells into the ECS. The increase of  $\text{K}^+$  content in edema fluid is clearly demonstrable. The decrease of  $\text{Na}^+$  content is only evident after administration of ouabain. Apparently the hypoxia has been sufficient to produce this effect; the shift of  $\text{Na}^+$  from the ECS being proportional to the reduction of the ECS, as a result of which no change of  $\text{Na}^+$  concentration ensues in the edema fluid.

The impedance measurements demonstrate a decrease of the ECS occurring during hypoxia or following the injection of ouabain. The rate of propagation of the front of edema fluid proceeds more or less constantly to a depth of 9 mm within the tissue, thereafter the rate decreases.

*In the light of the Starling hypothesis governing transcapillary fluid exchange it is conceivable that during hypoxia and after the administration of ouabain the COP of edema fluid - eventually even exceeding the plasma levels - not only causes retention of edema fluid, but even may induce a water movement to the tissue resulting in an aggravation of the edema.*

# lijst van gebruikte afkortingen

ADP	= adenosine 5'- difosfaat
ATP	= adenosine 5'- trifosfaat
BBB	= Blood-Brain Barrier = bloed-hersen barrière
BLB	= Blood-Liquor Barrier = bloed-liquor barrière
(r)CBF	= (regional) Cerebral Blood Flow = (locale) doorbloeding
COP	= Colloid Osmotic Pressure = colloïdosmotische druk
CPK	= creatine-fosfaatdehydrogenase
CPK	= iso-enzym van het CPK
CSF <sup>iso</sup>	= Cerebrospinal Fluid = cerebrospinale vloeistof (d.i. liquor)
CSFP	= Cerebrospinal Fluid Pressure = cerebrospinale vloeistofdruk
CSS	= Cerebrospinal Space = cerebrospinale ruimte
ECF	= Extracellular Fluid = extracellulaire vloeistof
ECS	= Extracellular Space = extracellulaire ruimte
G6PDH	= glucose-6-fosfaatdehydrogenase
HK	= Hexokinase
HRP	= Horse-Radish Peroxidase = mierikswortelperoxidase
ICF	= Intracellulair Fluid = intracellulaire vloeistof
ICP	= Intracranial Pressure = intracraniële druk
ICS	= Intracellular Space = intracellulaire ruimte
IFP	= Interstitial Fluid Pressure = interstitiële vloeistofdruk
i.p.	= intraperitoneaal
i.v.	= intraveneus
IVP	= Intravascular Pressure = intravasculaire druk
(K <sup>+</sup> )	= concentratie van kalium
LBB	= Liquor-BrainBarrier = liquor-hersen barrière
LDH	= Lactaatdehydrogenase
LDH <sub>iso</sub>	= iso-enzym van het LDH
NAD(P)	= nicotinamide-adeninedinucleotide(-fosfaat)
(Na <sup>+</sup> )	= concentratie van natrium
P	= arteriële bloeddruk
P <sup>a</sup>	= koolzuurspanning
P <sup>CO<sub>2</sub></sup>	= anorganisch fosfaat
P <sup>i</sup>	= zuurstofspanning
P <sup>O<sub>2</sub></sup>	= veneuze bloeddruk
P <sup>y</sup>	= (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> Sn <sup>+</sup> = triethyltin
TET	= steekproefstandaarddeviatie
SD	= steekproefstandaarddeviatie
2,4-DNP	= 2,4-dinitrofenol

# literatuuroverzicht

- ADACHI, C., H. MIHARA, O. MATSUO. Fluid pressure of capsules implanted into dog brain. *Jap.J.Physiol.* 24 (1974a) 45.
- ADACHI, C., H. MIHARA, O. MATSUO. Analysis of fluid in capsules implanted into dog brain. *Jap.J.Physiol.* 24 (1974b) 59.
- AGRAWAL, H.C., J.N. DAVIS, W.A. HINWICH. Water content of developing kitten brain. *J.Neurochem.* 14 (1967) 179.
- ALEU, F.P., R. KATZMAN, R.D. TERRY. Fine structure and electrolyte analyses of cerebral edema induced by alkyltin intoxication. *J.Neurop.Exp.Neurol.* 22 (1963) 403.
- ALEU, F.P., F.L. EDELMAN, R. KATZMAN, L.C. SCHEINBERG. Ultrastructural and biochemical analysis in cerebral edema associated with experimental mouse gliomas. *J.Neurop.Exp. Neurol.* 23 (1964) 253.
- AHMED, N., A. VAN HARREVELD. The iodide space in rabbit brain. *J.Physiol.* (London) 204 (1969) 31.
- ARIEFF, A.I., C.R. KLEEMAN, A. KEUSHKERIAN, H. BAGDOYAN. Brain tissue osmolality. *J.Lab.Clin.Med.* 79 no 2 (1972) 334.
- AUKLAND, K. Autoregulation of interstitial fluid volume. *Scand.J.Clin. Lab.Invest.* 31 no 3 (1973) 247.
- AUKLAND, K., H.M. JOHNSEN. A colloid osmometer for small fluid samples. *Acta Physiol.Scand.* 90 (1974) 485.
- BAETHMANN, A., A. VAN HARREVELD. Water and electrolyte distribution in gray matter rendered edematous with a metabolic inhibitor. *J.Neurop. Exp.Neurol.* 32 (1973) 408.
- BAETHMANN, A., W. LANKSCH, P. SCHMIEDEK. Formation and treatment of cerebral edema. *Neurochirurgica* 17 no 2 (1974) 37.
- BAETHMANN, A., K. SOHLER. Electrolyte- and fluid- spaces of rat brain in situ after infusion with dinitrophenol. *J.Neurobiol.* 6 no 1 (1975)
- BAKAY, L., I.U. HAQUE. Morphological and chemical studies in cerebral edema. *J. Neurop.Exp.Neurol.* 23 no 3 (1964) 393.
- BAKAY, L., J.C. LEE. In: *Cerebral edema*. Charles C. Thomas, Springfield, U.S.A. (1965).
- BAKAY, L., R.J. KURLAND, R.G. PARRISH, J.C. LEE, R.J. PENG, H.M. BARTKOWSKI. Nuclear magnetic resonance studies in normal and edematous brain tissue. *Exp.Brain.Res.* 23 (1975) 241.
- BAKER, R.N., P.A. CANCELLA, P.S. POLLOCK, S.P. FROMMES. The movement of exogenous protein in experimental cerebral edema. *J.Neurop.Exp. Neurol.* 30 (1971) 668.
- BAYER, P.M., F. GABL, G. GRANDITSCH, K. WILDHALM, H. ZYMAN, E. DEUTSCH. Creatine kinase isoenzymes in cerebrospinal fluid in a case of brain damage. *Clin.Chem.* 22 (1976) 1405.
- BEKS, J.W.F., C.A. ter WEEME, E.J. EBELS. Alterations in the intraventricular pressure in cats after cold induced edema. In: *Brain Edema*. Springer-Verlag, New York (1967a) 564.
- BEKS, J.W.F., C.A. TER WEEME. The influence of urea and mannitol on increased intraventricular pressure in cold-induced cerebral oedema. *Acta Neurochirurg.* 16 Fasc. 1-2 (1967b) 7.
- BEKS, J.W.F. De Cushing-response bij verhoogde intracraniale druk. *Ned.T.Geneesk.* 117 no 47 (1973) 1770.
- BEKS, J.W.F. De behandeling van de verhoogde intracraniale druk tengevolge van hersenoedeem na het trauma capitis. *Acta Chir.Belg.* 73 (1974) 628.

- BELL, G.H., J.N. DAVIDSON, H. SCARBOROUGH. Textbook of physiology & biochemistry. Livingstone Ltd. London (1959).
- BINGHAM, W.G., S.E. PAUL, K.S. SURYANARAYANA SASTRY. Effect of cold injury on six enzymes in rat brain. Arch.Neurol. 21 (1969) 649.
- BITO, L., H. DAVSON. Local variations in composition of the cerebrospinal fluid. J.Physiol. 179 (1965) 73P.
- BLANK, W.F., H.S. KIRSCHNER. The kinetics of extracellular potassium changes during hypoxia and anoxia in the cat cerebral cortex. Brain Res. 123 (1977) 113.
- BOLWIG, T.G., N.A. LASSEN. The diffusion permeability to water of the rat blood-brain barrier. Acta Physiol.Scand. 93 (1975) 415.
- BOURKE, R.S., H.L. GABELNICK, O. YOUNG. Mediated transport of chloride from blood into cerebrospinal fluid. Exp.Brain Res. 10 (1970) 17.
- BRADBURY, M.W.B., H. DAVSON. The transport of potassium between blood, cerebrospinal fluid and brain. J.Physiol. (London) 181 (1965) 151.
- BRIGHTMAN, M.W., I. KLATZO, Y. OLSSON, T.S. REESE. The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. J. Neurol.Sci. 10 (1970) 215.
- BRIGHTMAN, M.W., M. HORI, S.I. RAPOPORT, T.S. REESE, E. WESTERGAARD. Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. J.Comp. Neurol. 152 (1973) 317.
- BRØNDSTED, H.E. Ouabaine-sensitive carrier-mediated transport of glucose from the cerebral ventricles to surrounding tissue in the cat. J.Physiol. 208 (1970) 187.
- BRØNDSTED, H.E. Transport of glucose, sodium, chloride and potassium between the cerebral ventricles and surrounding tissue in cats. Acta Physiol.Scand. 79 (1970) 523.
- BRONISZEWSKA - ARDELT, B., JONGKIND, J.F. Effect of hypoxia on substrate levels in the brain of the adult mouse. J.Neurochem. 18 (1971) 2237.
- BUCKELL, M. M.C. ROBERTSON. Enzyme studies in cerebral tumors. Lactate dehydrogenase, glucose phosphate isomerase, acid and alkaline phosphatase in plasma, ventricular cerebrospinal fluid and tumor cyst fluid from cases of glioma and cerebral secondary carcinoma. Br.J.Cancer 19 (1965) 83.
- BUCKELL, M., M.R. CROMPTON, M.C. ROBERTSON, G.K. BARNES. Lactate dehydrogenase in cerebral cyst fluids. Total activity and isoenzyme distributions as an index of malignancy. J.Neurosurg. 32 (1970) 545.
- CASLEY-SMITH, J.R., E. FÖLDI-BÖRCSÖK, M. FÖLDI. The prelymphatic pathways of the brain as revealed by cervical lymphatic obstruction and the passage of particles. Br.J.Exp.Path. 57 (1976) 179.
- CLARKE, E., C.D. O'MELLEY. In: The human brain and spinal cord. Univ. Cal.Press (1968).
- CLASEN, R.A., P.M. COOKE, S. PANDOLFI, D. BOYD, A.J. RAIMONDI. Experimental cerebral edema produced by focal freezing. 1. An anatomical study utilizing vital dye techniques. J.Neurop.Exp.Neurol. 21 (1962) 579.
- CLASEN, R.A., H.H.SKY-PECK, S. PANDOLFI, I. LAING, G.M. HASS. The chemistry of isolated edema fluid in experimental cerebral injury. In Brain Edema. Springer Verlag, New York, (1967) 536.
- CLEMENTE, C.D., E.A. HOLST. Pathological changes in neurons, neuroglia and blood-brain barrier induced by X-irradiation of heads of monkeys. Arch.Neurol.Psychiat. 71 (1954) 66.
- CORNOG, J.L., N.K. GONATAS, B.S. FEIERMAN. Effects of intracerebral injections of ouabaine on the fine structure of rat cerebral cortex. Am.J.Pathol. 51 no 4 (1967) 573.
- CRONE, C. General properties of the blood-brain barrier with special emphasis on glucose. Fluid environment of the brain. Academic Press, Inc. New York (1975) 33.



- CROSFILL, M.L., J.G. WIDDICOMBE. The physical characteristics of the chest and lungs and the work of breathing in different mammalian species. *J.Physiol.* 158 (1961) 1.
- CSERR, H.F. Physiology of the choroid plexus. *Physiol.Rev.* 51 no 2 (1971) 273.
- CSERR, H., J.D. FENSTERMACHER, V. FENCL. In: Fluid environment of the brain. Acad.Press, Inc. New York (1975).
- CUTLER, R.W.P., G.V. WATTERS, C.F. BARLOW. I<sup>125</sup>-labeled protein in experimental brain edema. *Arch.Neurol.* 11 (1964) 225.
- DAVSON, H. Physiology of the cerebrospinal fluid. J.& A. Churchill Ltd. (1967).
- DAVSON, H., J.R. HOLLINGSWORTH. Active transport of I<sup>131</sup> across the blood-brain barrier. *J.Physiol.* 233 (1973) 327.
- DAVSON, H. The blood-brain barrier. *J.Physiol.* 225 (1976) 1.
- EBELS, E.J. Morfologische aspecten van hersenoedeem. *Ned.T.Geneesk.* 111 no 9 (1967) 397.
- ELLIOT, K.A.C., H. JASPER. Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage. *Am.J.Physiol.* 157 (1949) 122.
- FABER, T.M., H. SORER, N.B. FIZETTE. A method for the quantitative estimation of blood-brain barrier (BBB) damage. *Res.Comm.Chem.Path. Pharm.* 8 no 3 (1974) 431.
- FADNES, H.O. Effect of increased venous pressure on the hydrostatic and colloid osmotic pressure in subcutaneous interstitial fluid in rats: edema-preventing mechanisms, *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 36 (1976) 371.
- FEIGIN, I., G. BUDZILOVICK, S. WEINBERG, J. OGATA. Degeneration of white matter in hypoxia, acidosis and edema. *J. Neurop.Exp.Neurol.* 32 no. 1 (1973) 125.
- FENSTERMACHER, J.D., C.L. LI, V.A. LEVIN. Extracellular space of the cerebral cortex of normothermic and hypothermic cats. *Exp.Neurol.* 27 (1970) 101.
- FENSTERMACHER, J.D., C.S. PATLAK, R.G. BLASBERG. Transport of material between brain extracellular fluid, brain cells and blood. *Fed.Proc.* 33 no 9 (1974) 2070.
- FENSTERMACHER, J.D., C.S. PATLAK. The exchange of material between cerebrospinal fluid and brain. In: Fluid environment of the brain. Acad.Press, Inc. New York (1975) 201.
- FENSKE, A., M. SAMII, H.J. REULEN, O. HEY. Extracellular space and electrolyte distribution in cortex and white matter of dog brain in cold induced oedema. *Acta Neurochir.* 28 (1973) 81.
- FISHER, R.G. The cerebrospinal fluid. *Mayo Clin.Proc.* 50 (1975) 482.
- FISHMAN, R.A. Brain edema. *Nw.Engl.J.Med.* (1975) 706.
- FLÓREZ, G., A. CABEZA, J.M. GONZALEZ, J. GARCIA, S. UCAR. Changes in serum and cerebrospinal fluid enzyme activity after head injury. *Acta Neurochir.* 35 (1976) 3.
- FREI, H.J., Th. WALLENFANG, W. PÖLL, H.J. REULEN, R. SCHUBERT, M. BROCK. Regional cerebral blood flow and regional metabolism in cold induced edema. *Acta Neurochir.* 29 (1973) 15.
- FRIEDHOFF, A.J., M.H. LERNER. Creatine kinase isoenzyme associated with synaptosomal membrane and synaptic vesicles. *Life Sci.* 20 (1977) 867.
- FUJITA, S., T. UEDA, M. YAGI. Detection of experimental and clinical brain edema using an electrical impedance method. *J.Neurosurg.* 37, (1972) 156.
- GALEN, R.S. The enzyme diagnosis of myocardial infarction. *Human Pathol.* 6 (1975) 14.
- GANSER, V., I. BOKSAY. Effect of pentoxifylline on cerebral edema in cats. *Neurology* (1974) 487.



- GARDNER, W.J. The plasma protein barriers. *J. Neurol.Sci.* 15 (1972) 1.
- GERBER, A.M., S. MULLAN. Intracranial hypertension. *Postgrad.Med.* 55 no 6 (1974) 83.
- GIACOMELLI, F., J. WIENER, D. SPIRO. The cellular pathology of experimental hypertension. V. Increased permeability of cerebral arterial vessels. *Am.J.Pathol.* 59 no 1 (1970) 134.
- GO, K.G., E.J. EBELS, J.W.F. BEKS, C.A. TER WEEME. The spreading of cerebral edema from a cold injury in cats. *Psych.Neurol.Neurochir.* 70 (1967) 403.
- GO, K.G. Studies over hersenoedeem. Proefschrift, Groningen 1970.
- GO, K.G., P.H. VAN DER VEEN, E.J. EBELS, F. VAN WOUDEBERG. A study of electrical impedance of oedematous cerebral tissue during operations. *Acta Neurochir.* 27 (1972) 113.
- GO, K.G., W.G. ZIJLSTRA, H. FLANDERIJN, F. ZUIDERVEEN. Circulatory factors influencing exudation in cold-induced cerebral edema. *Exp. Neurol.* 42 (1974) 332.
- GO, K.G., J.J. PRATT. The dependence of the blood to brain passage of radioactive sodium on blood pressure and temperature. *Brain Res.* 93 (1975a) 462.
- GO, K.G., T. EDZES. Water in brain edema. *Arch.Neurol.* 32 (1975b) 462.
- GO, K.G. De cerebrale vochthuishouding. *Ned.T.Geneesk.* 119 no 44 (1975c) 1715.
- GO, K.G., W.R. PATBERG, A.W. TEELKEN, J. GAZENDAM. The Starling hypothesis of capillary fluid exchange in relation to brain edema. In: *Dynamics of brain edema.* Springer-Verlag, New York (1976) 63.
- GOLDMAN, E.E. Vitalfärbung am Zentral-Nervensystem. *Abhandlungen der königlich preussischen Akademie der Wissenschaften* (1913) 1 -60.
- GOLDSTEIN, G.W., J.S. WOLINSKY, J. CSEJTEY. Isolated brain capillaries: a model for the study of lead encephalopathy. *Ann.Neurol.* 1 (1977) 235.
- GONATAS, N.K., H.M. ZIMMERMAN, S. LEVINE. Ultrastructure of inflammation with edema in the rat brain. *Am.J.Path.* 42 (1963) 455.
- GRAUNE, A., S. ADLER, H. FÄSSLER, H.P. RIEDER, M. SCHÄRER, R. WÜTHRICH. Liquorprotein - Elektrophoresen bei nicht entzündlichen Erkrankungen der Zentralnervensystem. *Schweitz.med.Wschr.* 106 (1976) 1602.
- GUISO, R., A.I. ARIEFF, S.G. MASSRY. Effects of glycerol administration on experimental brain edema. *Neurology* 26 (1976) 69.
- GUYTON, A.C., H.J. GRANGER, A.E. TAYLOR. Interstitial fluid pressure. *Physiol.Rev.* 51 no 3 (1971) 527.
- HÄGGENDAL, E., B. JOHANSSON. Effect of increased intravascular pressure on the blood-brain barrier to protein in dogs. *Acta Neurol.Scand.* 48 (1972) 271.
- HANSEN, H.J. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult rat brain cortex during anoxia. *Acta Physiol.Scand.* 88 (1977) 412.
- VAN HARREVELD, A., J.P. Schadé. On the distribution and movements of water and electrolytes in the cerebral cortex. *Proc. 2nd. Int. Meeting Neurobiol. Amsterdam "Structure and Function of the cerebral cortex"* Elsevier (1959) 253.
- VAN HARREVELD, A. Brain tissue electrolytes. Butterworths, London 1966.
- HERRMANN, H.D., D. NEUENFELDT. Development and regression of a disturbance of the blood-brain barrier and of edema in tissue surrounding a circumscribed cold lesion. *Exp.Neurol.* 34 (1972) 115.
- HERSCHKOWITZ, N., B.B. Mac GILLIVRAY, J.N. CUMINGS. Biochemical and electrophysiological studies in experimental cerebral oedema. *Brain* 88 (1965) 557.
- HILDEBRAND, J., S. LEVINE. Enzymatic activities in cerebrospinal fluid

- in patients with neurological diseases. *Acta Neurol.Belg.* 73 (1973) 229.
- HIRANO, A., H.M. ZIMMERMAN, S. LEVINE. Intramyelinic and extracellular spaces in triethyltin intoxication. *J. Neurop.Exp.Neurol.* 27 (1968) 571.
- HIRANO, A., N.H. BECKER, H.M. ZIMMERMAN. Pathological alterations in the cerebral endothelial cell barrier to peroxidase. *Arch.Neurol.* 20 (1969) 300.
- HOCHWALD, G.M., A. WALD, C. MALHAN. The effect of osmotic gradients on cerebrospinal fluid production and its sodium ion content, and on brain water content. *Trans.Am.Neurol.Assoc.* 99 (1974) 219.
- HOCHWALD, G.M., A. WALD, C.MALHAN. The sinkaction of cerebrospinal fluid volume flow. *Arch.Neurol.* 33 (1976) 339.
- HORSTMANN, E., H. MEVES. Die Feinstruktur des molekularen Rindengraues und ihre physiologische Bedeutung. *Z.Zellforsch.* 49 (1959) 569.
- HOSSMANN, K.A., S. TAGAKI. Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp.Neurol.* 51 (1976) 124.
- HU, K.H., R.L. FRIEDE. Effect of osmolarity of CSF and temperature on the extracellular space. *J. Neurop.Exp.Neurol.* 32 no 4 (1973) 485.
- HUSTED, R.F., D.J. REED. Regulation of cerebrospinal fluid potassium by the cat choroid plexus. *J.Physiol.* 259 (1976) 213.
- ISHII, S., E. TANI. Electron microscopic study of the blood-brain barrier in brain swelling. *Acta Neuropath.* 1 (1962) 474.
- ISHII, S., H. TSUJI, K. OZAWA, Y. KONDO, J.P. EVANS. Brain edema. Some clinical and experimental correlations. In: *Brain Edema*. Springer-Verlag, New York (1967) 32.
- ITANO, M. The detection of CPK (BB) in serum. A summary of sixteen cases. *A.J.C.P.* 65 (1975) 351.
- JOHANSON, C.E., D.J. REED, D.M. WOODBURY. Active transport of sodium and potassium by the choroid plexus of the cat. *J.Physiol.* 241 (1974) 359.
- JOHANSSON, B.B. Some factors influencing the damaging effect of acute arterial hypertension on cerebral vessels in rats. *Clin.Sci.Mol. Med.* 51 (1976) 41S.
- JOHANSSON, B.G. Agarose gel electrophoresis. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 29 suppl. 124 (1972) 7.
- JOHNSON, H.M. Measurement of colloid osmotic pressure of interstitial fluid. *Acta Physiol.Scand.* 91 (1974) 142.
- KALTIALA, E.H., E.S. HEIKKINEN, N.I. KÄRKI, T.K.I. LARMI. Cerebrospinal fluid and serum transaminases and lactic dehydrogenase after head injury. *Acta Neurol.Scand.* 44 (1968) 124.
- KALUŽA, J. Experimental brain edema. Comparison of the brain wound and cryogenic necrosis. *Acta Med.Pol.* 12 no 4 (1971) 487.
- KANIG, K. Einführung in die allgemeine und klinische Neurochemie. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, (1973).
- KASTE, M., H. SOMER, A. KONTTINEN. Brain-type creatine kinase isoenzyme. *Arch.Neurol.* 34 (1977) 142.
- KATZMAN, R., H.M. PAPPUS. Brain electrolytes and fluid metabolism. William & Wilkins Company. Baltimore (1973).
- KINDT, G.W., M. BROCK, L.L. ALTENAU, W. PÖLL. Blood-brain barrier and brain oedema in ammonia intoxication. *Lancet* (22 jan. 1967) 201.
- KINUMAKI, H., H. TAKEUCHI, K. OHMI. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in neuroblastoma. *Europ.J.Pediat.* 123 (1976) 83.
- KIRSHNER, H.S., W.F. BLANK, R.E. MYERS. Brain extracellular potassium activity during hypoxia in the cat. *Neurology* 25 no 11 (1975) 1001.
- KIRSHNER, H.S., W.F. BLANK, R.E. MEYERS. Changes in cortical subarachnoi

- fluid potassium with hypoxia. Arch.Neurol. (Chic) 33 (1976) 84.
- KLATZO, I., J. MIQUEL, R. OTENASEK. The application of fluorescein labeled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. Acta Neuropath. 2 (1962) 144.
- KLATZO, I, F. SEITELBERGER. Brain Edema, Symposium Vienna 1965. Springer-Verlag, New York (1967).
- KLATZO, I. Neuropathological aspects of brain edema. J.Neurop.Exp. Neurol. 26 no 1 (1967a) 1.
- KLATZO, I., H. WIŚNIEWSKI, O. STEINWALL, E. STREICHER. Dynamics of cold injury edema. In: Brain Edema. Springer-Verlag, New York (1967b) 554.
- LAASKO, M.L., S.S. OJA. Factors influencing the inuline space in cerebral cortex slices from adult and 7-day-old rats. Acta Physiol. Scand. 97 (1976) 486.
- LAMPERT, P., F. GARRO, A. PENTSCHEW. Lead encephalopathy in suckling rats. In: Brain Edema. Springer-Verlag, New York (1967) 207.
- LAURSEN, H., H. SCHRØDER, E. WESTERGAARD. The effect of portocaval anastomosis on the permeability to horseradish peroxidase of cerebral vessels of the rat. Acta Path.Microbiol.Scand. 83A, Fasc. 2 (1975) 266.
- LEAF, A. Regulation of intracellular fluid volume and disease. Am.J. Med. 49 (1970) 291.
- LEDERER, W.H., H.L. GERSTBREIN. Creatine kinase isoenzyme BB activity in serum of a patient with gastric cancer. Clin.Chem. 22 no 10 (1976) 1748.
- LEE, J., J. OLSZEWSKI. Permeability of cerebral blood vessels in healing of brain wounds. Neurology 9 (1959) 7.
- LEE, J.C., L. BAKAY. Ultrastructural changes in the edematous central nervous system. Triethyltin Edema. Arch.Neurol. 13 (1965) 48.
- LEE, J.C., L. BAKAY. Ultrastructural changes in the edematous central nervous system. II. Cold induced edema. Arch.Neurol. 14 (1966) 36.
- LINDBLOM, U., I. VRETHAMMER, B. ABERG. Isoenzym av mjölksyradehydrogenas vid hjärnskada. Nordisk Medicin 77 (1967) 337.
- LING, G.N., C.L. WALTON. A simple rapid method for the quantitative separation of the extracellular fluid in frog muscles. Physiol. Chem. & Physics 7 (1975) 215.
- LIPPMANN, H.G. Energiereiche Phosphate, Glukose, Laktat und Pyruvat im Hirn der Ratte unter Änderung des  $pO_2$  der Inspirationsluft. Acta biol.Med.German. 27 (1971) 805.
- LORENZO, A.V., J. SMOLY-CARUTHERS, E. GREENE. Development of amino acid transport mechanism in the choroid plexus. In: Fluid environment of the brain. Acad.Press, Inc. New York (1975) 167.
- LUM, G., A.L. LEVY. Chromatographic and electrophoretic separation of creatine kinase isoenzymes compared. Clin.Chem. 21 no 11 (1975) 1601.
- LUSE, S.A., B. HARRIS. Electron microscopy of the brain in experimental edema. J.Neurosurg. 17 (1960) 439.
- MAAS, A.I.R. Cerebrospinal fluid enzymes in acute brain injury. Proefschrift, Rotterdam, (1977).
- MANZ, H.J. Pathology of cerebral edema. Hum.Pathol. 5 (1974) 291.
- MCCORMICK, D., I.V. ALLEN. The value of LDH isoenzymes in the rapid diagnosis of brain tumors. Neuropath.Appl.Neurobiol. 2 (1976) 269.
- MELBY, E.C., N.H. ALTMAN. Handbook of Laboratory animal science. Volume II. CRC Press (1974).
- MILHORAT, T.H., M.K. HAMMOCK, J.D. FENSTERMACHER, D.P. RALL, V.A. LEVIN. Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus and brain. Science 173 (1971) 330.
- MIQUEL, J., W. HAYMAKER. Brain edema induced by particle and ultraviolet radiation. In: Brain Edema. Springer-Verlag, New York (1967) 615.

- NAKAZAWA, S. Biochemical studies of cerebral tissues in experimentally induced edema. *Neurology* 19 (1969) 269.
- NEALON, D.A., A.R. HENDERSON. Separation of creatine kinase isoenzymes in serum by ion-exchange column chromatography. *Clin.Chem.* 21 no 3 (1975) 392.
- NELSON, P.V., W.F. CAREY, A.C. POLLARD. Diagnostic significance and source of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in cerebrospinal fluid of children with a variety of neurological disorders. *J.Clin. Path.* 28 (1975) 828.
- NELSON, S.R., M.L. MANTZ, J.A. MAXWELL. Use of specific gravity in the measurement of cerebral edema. *J.Appl.Physiol.* 30 no 2 (1971) 268.
- NICHOLSON, P.W. Specific impedance of cerebral white matter. *Exp. Neurol.* 13 (1965) 386.
- OLDENDORF, W.H., H. DAVSON. Brain extracellular space and the sink action of cerebrospinal fluid. *Arch.Neurol.* 17 (1967) 196.
- OLDENDORF, W.H., M.E. CORNFORD, W.J. BROWN. The large apparent work capability of the blood-brain barrier. A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of Neurol.* 1 no 5 (1977) 409.
- OLSSON, Y., K.A. HOSSMANN. Fine structural localisation of exudated protein tracers in the brain. *Acta Neuropath.* (Berl) 16 (1970) 103.
- OLSSON, Y., E. SVENSSJÖ, K.E. ARFORS, D. HULTSTRÖM. Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta Neuropath.* (Berl.) 33 (1975) 45.
- PAPPIUS, H.M., D.R. GULATI. Water and electrolyte content of cerebral tissue in experimentally induced edema. *Acta Neuropath.* 2 (1963) 451.
- PAPPIUS, H.M. Biochemical studies on experimental brain edema. In: *Brain Edema*. Springer-Verlag, New York (1967) 445.
- PAPPIUS, H.M. Fundamental aspects of brain edema. In: *Handbook of clinical neurology*, 16 part 1. 167. North-Holland publishing Comp. (1974).
- PAPPIUS, H.M. Normal and pathological distribution of water in brain. In: *Fluid environment of the brain*. Acad.Press, Inc. New York (1975) 183.
- PATBERG, W.R. De colloïdosmotische druk van oedemateus hersenweefsel na koudelaesie bij de kat. Doctoraalscriptie R.U. Groningen (1975).
- PATBERG, W.R., K.G. GO, A.W. TEELKEN. Isolation of edema fluid in cold-induced cerebral edema for the study of colloid osmotic pressure, lactate dehydrogenase activity and electrolytes. *Exp. Neurol.* 54 (1977) 141.
- PATLAK, C.S., J.D. FENSTERMACHER. Comparison of methods for determining blood-brain barrier permeability. In: *Fluid environment of the brain*. Acad.Press, Inc. New York (1975) 47.
- PAULSON, O.B., M.M. HERTZ, T.G. BOLWIG, N.A. LASSEN. Filtration and diffusion of water across the blood-brain barrier in man. *Microvasc.Res.* 13 (1977) 113.
- PAZZAGLI, A., G. ARNETOLI, I. PEPEU. Fatty acid changes of cerebrospinal fluid in neurological disorders as an index of changes in the blood-brain barrier. *Neurology* 20 (1970) 783.
- PERSSON, L. Cellular reaction to small cerebral stab-wounds in the rat frontal lobe. *Virchows Arch.B.Cell.Path.* 22 (1976a) 21.
- PERSSON, L., H.A. HANSSON, P. SOURANDER. Extravasation, spread and cellular uptake of evans blue-labelled albumine around a reproducible small stab-wound in the rat brain. *Acta Neuropath.* (Berl) 34 (1975b) 125.
- PERSSON, L., H.A. HANSSON. Reversible blood-brain barrier dysfunction to peroxidase after a small stab-wound in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropath.* (Berl) 35 (1976c) 333.

- POLLAY, M. Formation of cerebrospinal fluid. Relation of studies of isolated choroid plexus to the standing gradient hypothesis. *J. Neurosurg.* 42 (1975) 665.
- PRINCE, D.A., H.D. LUX, E. NEHER. Measurements of extracellular potassium activity in cat cortex. *Brain Res.* 50 (1973) 489.
- RABOW, L., G. TIBBLING. Serum enzyme activity of hydroxybutiric dehydrogenase (HBD) and heat inactivated lactate dehydrogenase (LD) after operations on intracranial aneurysms. *Acta Neurochir.* 32 (1975) 199.
- RABOW, L. Lactate dehydrogenase (LD), hydroxybutyrate dehydrogenase (HBD), and LD-isoenzymes in brain tissue. *Acta Neurochir.* 36 (1977a) 61.
- RABOW, L., K. KRISTENSSON. Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in patients with tumor of the central nervous system. *Acta Neurochir.* 36 (1977b) 71.
- RABOW, L., G. TIBBLING. Serum activities of hydroxybutyrate dehydrogenase (HBD) and the isoenzymes of lactate dehydrogenase (LD) as an index of traumatic brain injury. *Acta Neurochir.* 37 (1977c) 245.
- RAICHLE, M.D., J.O. EICHLING, R.L. GRUBB. Brain permeability of water. *Arch. Neurol.* 30 (1974) 319.
- RAIMONDI, A.I., J.P. EVANS, S. MULLAN. Studies of cerebral edema III. Alterations in the white matter: an electron microscopic study using ferritin as a labeling compound. *Acta Neuropath.* 2 (1962) 177.
- RANCK, J.B. Specific impedance of rabbit cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 7 (1963a) 144.
- RANCK, J.B. Analysis of specific impedance of rabbit cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 7 (1963b) 153.
- RANCK, J.B., S.L. BEMENT. The specific impedance of the dorsal columns of cat: an anisotropic medium. *Exp. Neurol.* 11 (1963) 451.
- RAPOPORT, S.I., I. KLATZO. Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Science* 173 (1971) 1026.
- RAPOPORT, S.I. Reversible opening of the blood-brain barrier by osmotic shrinkage of the cerebrovascular endothelium: opening of the tight junctions as related to carotid arteriography. In: *Small vessel angiography*. Mosby Company U.S.A. (1973) 137.
- RAPOPORT, S.I. Blood-brain barrier in physiology and medicine. Raven Press, New York (1976a).
- RAPOPORT, S.I. Opening of the blood-brain barrier by acute hypertension. *Exp. Neurol.* 52 (1976b) 467.
- RASMUSSEN, L.E., I. KLATZO. Protein and enzyme changes in cold injury edema. *Acta Neuropath.* 13 (1969) 12.
- REED, D.J., D.M. WOODBURY, R.L. HOLTZER. Brain edema, electrolytes, and extracellular space. *Arch. Neurol.* 10 (1964) 604.
- REICHARDT, M. über die Bestimmung der Schädelkapazität an der Leiche. *Alg. Z. Psychiat.* 62 (1955) 787.
- REINGLASS, J.L. Dose response curve of intravenous glycerol in the treatment of cerebral edema due to trauma. *Neurology* 24 (1974) 743.
- RENKAWEK, K., G. PALLADINI, L.A. IERADI. Morphology of glia-culture in vitro in presence of ouabain. *Brain Res.* 18 (1970) 363.
- REULEN, H.J., H.G. KREYSCH. Measurement of brain tissue pressure in cold induced cerebral oedema. *Acta Neurochir.* 29 (1973) 29.
- REULEN, H.J. Vasogenic brain edema. New aspects in its formation, resolution and therapy. *Br. J. Anaesth.* 48 (1976) 741.
- REULEN, H.J., R. GRAHAM, M. SPATZ, I. KLATZO. Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J. Neurosurg.* 46 (1977) 24.
- RUBINSTEIN, L.J., I. KLATZO, J. MIQUEL. Histochemical observations on oxidative enzyme activity of glial cells in a local brain injury.

- J.Neurop.Exp.Neurol. 21 no 1 (1962) 116.
- RÜNKE, C.L., C. VAN EEDEN. Statistiek voor medicij. Stafleu & Zn. Leiden. (1961).
- RYDER, H.W., F.F. ESPEY, F.D. KIMBELL, E.J. PENKA, A. ROSENAUER, B. PODOLSKY, J.P. EVANS. The mechanism of the change in cerebrospinal fluid pressure following an induced change in the volume of the fluid space. Lab.Clin.Med. 41 (1953) 428.
- SCHLIEP, G., K. Felgenhauer. The  $\alpha_2$ -Macroglobulin level in cerebrospinal fluid; a parameter for the condition of the blood-CSF barrier. J.Neurol. 207 (1974) 171.
- SCHOLANDER, P.F., A.R. HARGENS, S.L. MILLER. Negative pressure in the interstitial fluid of animals. Science 161 (1968) 321.
- SIEGEL, B.A., R.K. STUDER, E.J. POTCHEN. Brain  $^{22}$ Na uptake in experimental cerebral microembolism. J.Neurosurg. 38 (1973) 739.
- SIEGEL, J.G., R.W. ALBERS, R. KATZMAN, B.W. AGRANOFF. Basic neurochemistry. Little, Brown and Company. 2nd ed. (1976).
- SNASHALL, P.D., J. LUCAS, A. GUZ, M.A. FLOYER. Measurement of interstitial "fluid" pressure by means of a cotton wick in man and animals: an analysis of the origin of the pressure. Clin.Sci. 41 (1971) 35.
- SNIEDER, S.R., W.T. NIEMER. A stereotaxic atlas of the cat brain. Univ. of Chicago Press (1964).
- SOMER, H., M. KASTE, H. TROUPP, A. KONTTINEN. Brain creatine kinase in blood after acute brain injury. J.Neurol.Neurosurg.Psychiat. 38 (1975) 572.
- SOMJEN, G.G., M. ROSENTHAL, G. CORDINGLEY, J. LAMANNA, E. LOTHMAN. Potassium, neuroglia, and oxidative metabolism in central gray matter. Fed.Proc. 35 no.6 (1976) 1266.
- STEINWALL, O., I. KLATZO. Double tracer methods in studies on blood-brain barrier dysfunction and brain edema. Acta Neurol.Scand. 41 suppl. 13 (1965) 591.
- STERN W.E., R.V. COXON. Osmolality of brain tissue and its relation to brain bulk. Am.J.Physiol. 204 (1964) 1.
- STERRETT, P.R., A.M. THOMPSON, A.L. CHAPMAN, H.A. MATZKE. The effect of hyperosmolarity on the blood-brain barrier. A morphological and physiological correlation. Brain Res. 77 (1974) 281.
- STEWART-WALLACE, A.M. A biochemical study of cerebral tissue and of the changes in cerebral oedema. Brain 62 (1939) 426.
- STIFFEL, M., J. DITTMANN, K. FAULHAUER, F. LOEW. Liquorenzyme (HK, TIM, GAPDH, PGK, Enolase, PK, LDH, GPT, ChE) in normalen Proben, bei Hirntumoren und andere neurologischen Erkrankungen. Wien.Z. Nervenheilkunde 31 (1973) 325.
- STREICHLER, E., P.J. FERRIS, J.D. PROKOP, I. KLATZO. Brain volume and thiocyanate space in local cold injury. Arch.Neurol. 11 (1964) 444.
- STROMBERG, D.D., C.A. WIEDERHIELM. Interstitial fluid oncotic pressures in rabbit subcutaneous tissue. Am.J.Physiol. 231 no 3 (1976) 888.
- TANAKA, R., K. TANIMURA, K. UEKI. Ultrastructural and biochemical studies on ouabain - induced oedematous brain. Acta Neuropath. (Berl) 37 (1977) 95.
- TERANO, M. Measurement and clinical analysis of the fourteen major plasma proteins in the cerebrospinal fluid. Arch.Jap.Chir. 44 no 5 (1975) 383.
- TOBIAN, L. The influence of hydrostatic pressure and colloid osmotic pressure and colloid osmotic pressure on fluid transfer across the capillary membranes. In: Edema, Mechanisms and Management. A Hahnemann Symposium on salt and water retention. Saunders, Philadelphia (1960) 3.
- TOWER, D.B. Distribution of cerebral fluids and electrolytes in vivo



- and vitro. In: Brain Edema. Springer-Verlag New York (1967) 303.
- TOWFIGHI, J., N.K. GONATAS. Effect of intracerebral injection of ouabain in adult and developing rats. Lab.Invest. 28 no 2 (1973) 170.
- TSUNG, S.H. Creatine kinase isoenzyme patterns in human tissue obtained at surgery. Clin.Chem 22 no 2 (1976) 173.
- ULRICH, J. Grundriss der Neuropathologie. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg (1975).
- VEEN, K.J. VAN DER, A.F. WILLEBRANDS. Isoenzymes of creatine phosphokinase in tissue extracts and in normal and pathological sera. Clin. Chem. Acta 13 (1966) 312.
- VEEN, P.H. VAN DER, K.G. GO, F. ZUIDERVEEN, D. BUITER, J.J. VAN DER MEER. Electrical impedance of cat brain with cold-induced edema. Exp.Neurol. 40 (1973) 675.
- VISE, W.M., L. LISS, D. YASHON, W.E. HUNT. Astrocytic processes: A route between vessels and neurons following blood-brain barrier injury. J.Neurop.Exp.Neurol. 34 no 4 (1975) 324.
- VOGH, B.P., T.H. MAREN. Sodium, chloride and bicarbonate movement from plasma to cerebrospinal fluid in cats. Am.J.Physiol. 228 no 3 (1975) 673.
- VYSKOCIL, F., N. KRIZ, J. BURES. Potassium selective microelectrodes used for measuring the extracellular brain potassium during spreading depression and anoxic depolarisation in rats. Brain Res.
- WALD, A., G.M. HOCHWALD, C. MALHAN. The relationship between sodium influx and volume flow into the cerebral ventricles of cats. J. Neurochem. 25 (1975) 151.
- WASSENAAR, J.S., Biochemisch onderzoek naar de invloed van organotinverbindingen op hersenweefsel. Een model voor cytotoxisch hersenoedeem. Proefschrift, Groningen (1970).
- WASTERLAIN, C.G., J.B. POSNER. Cerebral edema in water intoxication. I. Clinical and chemical observations. Arch.Neurol. 19 (1968a) 71.
- WASTERLAIN, C.G., R.M. TORACK. Cerebral edema in water intoxication. II. An ultrastructural study. Arch.Neurol. 19 (1968b) 79.
- WEBSTER, H.F., A. AMES. Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation. J.Cell.Biol. 26 (1965) 885.
- WEENE, C.A. TER. Experimenteel hersenoedeem tengevolge van koude laesies. Proefschrift Groningen (1970).
- WESTERGAARD, E., K.G. GO, I. KLATZO, M. SPATZ. Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in Mongolian Gerbils. Acta Neuropath. (Berl) 35 (1976) 307.
- WILSON, J. Clinical application of cerebrospinal fluid creatine phosphokinase determination. J.Am.Vet.Med.Ass. 171 no 2 (1977) 200.
- WRIGHT, E.M. Mechanism of ion transport across the choroid plexus. J.Physiol. 226 (1972) 545.
- WRIGHT, E.M. Active transport of iodide and other anions across the choroid plexus. J.Physiol. 240 (1974) 535.
- YAMAGUCHI, H., S. SHIRAKATA, K. TAOMOTO, S. MATSUMOTO. Steroid treatment of brain edema. Surg.Neurol. 4 (1975) 5.
- YANAGIHARA, N.P. GOLDSTEIN, H.J. SVIEN, R.C. BAHN. Experimental cerebral edema: enzyme - histochemical study. Neurology 17 no 7 (1967) 669.
- YU, M.C., L. BAKAY, J.C. LEE. Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. Acta Neuropath. 22 (1972) 222.
- ZONDAG, H.A. Bepaling en diagnostische betekenis van de melkzuurdehydrogenase isoenzymen. Van Gorcum & Comp. N.V. Assen (1964).
- ZIJLSTRA, W.G., J.R. BRUNSTING, F. TEN HOOR, G.A. MOOK. Fysiologie van het interne milieu. Van Gorcum, Assen (1970).

